

**Sophoroselipide von *Candida bombicola*: Eine neue Molekülstruktur sowie
Anwendung von Ultraschall-Zellseparations-Technik als innovative Trennmethode zur
Erleichterung des Downstream Processing**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Olof Hendrik Palme
aus Fulda

1. Referent: apl. Professor Dr. Siegmund Lang
2. Referent: Professor Dr. Christoph Sylatk
eingereicht am: 28.07.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am: 15.10.2010

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Langer, O., Palme, O., Wray, V., Tokuda, H., Lang, S., 2006. Production and modification of bioactive biosurfactants. *Proc Biochem* **41**(10), 2138-2145.

Palme, O., Moszyk, A., Iphöfer, D., Lang, S., 2010. Selected microbial glycolipids: production, modification and characterization. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* **672**, In: Sen, R. (ed), *Biosurfactants*. Springer Science+Business Media, LLC, Landes Bioscience, pp. 185-202.

Palme, O., Comanescu, G., Stoineva, I., Radel, S., Benes, E., Develter, D., Wray, V., Lang, S., 2010. Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 663-673.

Tagungsbeiträge

Palme, O., Langer, O., Lang, S., 2006. Production and modification of surface- and bioactive glycolipids. European Symposium on Biochemical Engineering Science ESBES, Salzburg, Aug 2006

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig angefertigt. Die Arbeit erhielt bedeutende finanzielle Unterstützung durch das EU-Förderprojekt CRAFT 1999-72243, "Integrated Process for bio-surfactant synthesis at competitive cost allowing for their application in household cleaning and bio-remediation" (InBioSynAp).

Mein erster und besonderer Dank gebührt Herrn apl. Prof. Dr. S. Lang für die Überlassung des Themas und die Förderung sowie wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Durch seine fortwährende fachliche und menschliche Unterstützung hat er zum Erfolg dieser Arbeit wesentlich beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Sylatk danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jördening für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein weiterer besonderer Dank soll an die Partner des EU-Projektes InBioSynAp gehen. Hier ist Herr Dr. Dirk Develter von ECOVER hervorzuheben, der dieses Projekt ins Leben gerufen hat. Aber auch Herrn Prof. Dr. Sylatk, Herrn Prof. Dr. Benes, Prof. Dr. Horst Chmiel, Hans Ramaekers von Triqua, Herrn Dr. Niebelschütz von Argus Umweltbiotechnologie sowie Herrn Stephen Gallagher von Charis bin ich dankbar für die gute Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes. Auch bei Dr. Anke Neumann, Frank Leitermann sowie Ivana Magario möchte ich mich sehr herzlich für die gute Kooperationsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Ein besonderer Dank gilt dabei auch Dr. Stefan Radel für die Bereitstellung und Hilfe bei der Bedienung der komplexen Ultraschallapparatur.

Herrn Dr. V. Wray danke ich herzlich für die Aufnahme der komplexen NMR- und MS-Spektren und für seine Hilfe bei der Interpretation des umfangreichen Spektrenmaterials. Herrn Dr. M. Nimtz danke ich für die Aufnahme der MS und MS/MS Massenspektren.

Besonderer Dank gilt meinen Kollegen, die diese Arbeit nach Kräften praktisch unterstützt haben: Wolfgang Graßl, Alexis Koetchou Ngigha, George Comanescu, Lingzhu Wang, Anja Moszyk, Katrin Riedmann und Ivanka Stoineva.

Für interessante Gespräche, moralische und anderweitige Unterstützung sowie Essensbegleitung bedanke ich mich besonders und ohne Gewichtung durch Reihenfolge bei Andrea Holtkamp, Hajo Reershemius, Verena Böschen, Rolf Heckmann, Andrea Walzog, Hasan Cicek, Olaf Langer, Thomas Große, Sebastian Poth, Ariane Schwoerer und Julika Wrenger.

Vielen Dank meinen Eltern sowie meiner Schwester samt Familie, ohne Euch wäre das hier nicht möglich gewesen!

Eine kleine logistische Belastung, aber eine große moralische Hilfe waren meine Kinder Bjarne und Nils - vielen Dank und ich nehme Euch nicht übel!

Und schließlich meiner lieben Frau Wibke, durch die das Alles erst einen Sinn ergibt - ich liebe Dich.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1.	Tenside	1
1.2.	Biotenside	4
1.3.	Sophoroselipide	7
1.4.	Verschiedene andere Glycolipide	9
1.4.1.	Mannosylerythritolipide	10
1.4.2.	Rhamnoselipide	11
1.4.3.	Weitere zuckerbasierte Biotenside	13
1.4.3.1	Marine Glycoglycerolipide	13
1.4.3.2	Oligosaccharidlipide aus <i>Tsukamurella spec.</i>	13
1.5.	Bioprozesse mit integrierter Zellrückhaltung	15
1.5.1.	Ultraschalltrennung	16
1.5.2.	Membranfiltration	21
1.6	Zielsetzung	22
2.	Material und Methoden	23
2.1.	Mikroorganismus	23
2.2.	Chemikalien	23
2.3.	Nährmedien	25
2.3.1.	Vorkulturmedium	26
2.3.2.	Hauptkulturmedium	26
2.4.	Kulturführung	26
2.4.1.	Stammhaltung auf Agarplatten	26
2.4.2.	Vorkultur	27
2.4.3.	Kultivierung in Schüttelkolben	27
2.4.4.	Kultivierung im Bioreaktor	27
2.5.	Bestimmung der Kultivierungsparameter	29
2.5.1.	Biotrockenmasse	29
2.5.2.	pH-Wert	29
2.5.3.	Glucosekonzentration	30
2.5.4.	Saccharosekonzentration	30
2.5.5.	Bestimmung der Zellzahl	31
2.5.6.	Überprüfung der Zellvitalität	31
2.5.7.	Sauerstoffverbrauchsrate, Kohlendioxidbildungsrate und respiratorischer Koeffizient	32
2.5.8.	Ausbeutekoeffizienten	34
2.5.9.	Gewinnung des Produktes aus der Kultursuspension sowie gravimetrische Sophoroselipidbestimmung	35
2.6.	Chromatographische Methoden	36
2.6.1.	Dünnschichtchromatographie	36
2.6.1.1.	Stationäre und mobile Phase	36
2.6.1.2.	Sprühreagenzien	36
2.6.2.	Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatographie (MPLC)	37
2.6.3.	Strukturaufklärung durch Kernspinresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie	37
2.6.4.	Gaschromatographie/Massenspektrometrie	38
2.7.	Aufarbeitungstechniken	38
2.7.1.	Ultraschallseparation	39
2.7.2.	Crossflow-Filtration	40

3. Ergebnisse	41
3.1. Tests verschiedener Co-Substrate für die Sophoroselipid-Bildung	41
3.1.1. Zucker als alleinige C-Substrate	42
3.1.2. Alkane als Co-Substrate	44
3.1.3. Fettalkohole als Co-Substrate	47
3.1.4. Fettsäuren als Co-Substrate	56
3.1.5. Pflanzliche Öle als Co-Substrate	58
3.2. Tests verschiedener Separationstechniken für den Sophoroselipidbildner <i>Candida bombicola</i>	62
3.2.1. Ultraschall-Zellabtrennung mit <i>Candida bombicola</i>	62
3.2.1.1 Grundlegende Untersuchungen zur Durchführbarkeit der Ultraschall-Zellabtrennung mit <i>Candida bombicola</i>	63
3.2.1.2 Einfluss der Ultraschalltrennung auf die Überlebensfähigkeit von <i>Candida bombicola</i> -Zellen	66
3.2.1.3 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Trennleistung	67
3.2.1.3.1 Einfluss des Permeat-Durchsatzes auf die Trennleistung	67
3.2.1.3.2 Einfluss der Zellkonzentration auf die Trennleistung	68
3.2.1.3.3 Weitere Einflussgrößen für die Trennleistung	69
3.2.2. Membranfiltration mit <i>Candida bombicola</i>	73
3.3. Bioreaktorkultivierungen zur Gewinnung von Sophoroselipiden inkl. Tests der Ultraschall-Separations-technik	76
3.3.1. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, ohne Glucose-Nachfütterung	76
3.3.2. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, zusätzlich mit Glucose-Nachfütterung	80
3.3.2.1 Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, mit 10 g/(l·d) Glucose-Nachfütterung	80
3.3.2.2 Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, mit 30 g/(l·d) Glucose-Nachfütterung	82
3.3.2.3 Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, mit 50 g/(l·d) Glucose-Nachfütterung	84
3.3.2.4 Vergleich der Bioreaktorkultivierungen mit Glucose-Nachfütterung	86
3.3.3. Bioreaktorkultivierung mit integrierter Ultraschall-Zellabtrennung	87
3.3.3.1 Bioreaktorkultivierung ohne Glucose-Zufütterung, mit integrierter Ultraschall-Zellabtrennung	87
3.3.3.2 Bioreaktorkultivierung mit Glucose-Zufütterung von 50 g/(l·d), mit integrierter Ultraschall-Zellabtrennung	91
4 Diskussion	93
4.1. Tests verschiedener Co-Substrate für die Sophoroselipid-Bildung	96
4.1.1. Zucker als Substrate	96
4.1.2. Alkane als Co-Substrate	97
4.1.3. Fettalkohole als Co-Substrate	97
4.1.4. Fettsäuren als Co-Substrate	99
4.1.5. Pflanzliche Öle als Co-Substrate	99
4.2. Separationsexperimente	100
4.2.1. Ultraschall-Zellabtrennung mit <i>Candida bombicola</i>	101
4.2.2. Membranfiltration mit <i>Candida bombicola</i>	105
4.3. Bioreaktorkultivierungen zur Gewinnung von Sophoroselipiden inkl. Tests der Ultraschall-Separations-technik	106
4.3.1. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, ohne Glucose-Nachfütterung	107
4.3.2. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, mit Glucose-Nachfütterung	108
4.3.3. Bioreaktorkultivierung mit integrierter Ultraschall-Zellabtrennung	109

5	Zusammenfassung.....	111
6.	Literatur	113
7.	Abkürzungsverzeichnis	123
8.	Abbildungsverzeichnis	125
9.	Tabellenverzeichnis	129
10.	Lebenslauf	131

1. Einleitung

1.1. *Tenside*

Bei Tensiden handelt es sich um Moleküle, die derart aufgebaut sind, dass sie einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil aufweisen. Diese amphiphile Struktur macht sie zu grenzflächenaktiven Substanzen, insbesondere in wässrigen Umgebungen. Das bedeutet, dass sie sich an Grenz- und Oberflächen gerichtet anlagern, so dass der hydrophile Teil zum polaren Milieu weist und der hydrophobe Teil zum unpolaren. Beim unpolaren Anteil kann es sich dabei um nicht mit Wasser mischbare Flüssigkeiten, wie z. B. organische Lösungsmittel, sowie um Gase oder Feststoffe handeln. Durch die gerichtete Adsorption der Tensidmoleküle werden wichtige Eigenschaften des Mehrphasensystems beeinflusst, wie z.B. die Grenzflächenspannung zwischen den Phasen, die Benetzungseigenschaften von Wasser an Feststoffphasen oder die Blasengröße von Flüssigphasen. Diese Eigenschaften macht man sich in zahlreichen technischen Anwendungen nutzbar, hauptsächlich beim Einsatz als Wasch- und Reinigungsmittel zur verbesserten Löslichkeit von hydrophoben Schmutzstoffen in Wasser, aber auch als Schaumverstärker, Emulgator oder Stabilisator.

Eine wichtige Kenngröße unterschiedlicher Tenside ist dabei der Wert, auf den sie die Oberflächenspannung von Wasser unter Normalbedingungen zu reduzieren vermögen. Diese ist bei reinem Wasser mit 72 mN/cm relativ groß und kann durch Verwendung von Tensiden deutlich reduziert werden. Erhöht man die Tensidkonzentration über einen charakteristischen Wert hinaus, ergibt sich keine weitere Reduktion der Oberflächenspannung, da die komplette Grenzfläche mit einer monomolekularen Schicht von Tensidmolekülen gesättigt ist. Die zusätzlichen Moleküle richten sich vielmehr so aus, dass die hydrophoben Anteile zueinander weisen, während die hydrophilen Teile mit der wässrigen Umgebung interagieren. Diese Anordnung bezeichnet man als Micellen, die Konzentration, ab der sie gebildet werden, als kritische Micellenkonzentration (cmc). Die Micellenbildung ist reversibel, bei Verdünnung gehen die Moleküle wieder in Lösung und können mit vorhandenen

Grenzflächen interagieren (Abb. 1). Die cmc ist neben der Reduktion der Oberflächenspannung von Wasser eine weitere wichtige Kenngröße von Tensiden. In organischen Lösungsmitteln kehrt sich die Ausrichtung der Tensidmoleküle dergestalt um, dass die hydrophoben Anteile nach außen zeigen, während die hydrophilen miteinander wechselwirken. Diese Strukturen werden als inverse Micellen bezeichnet.

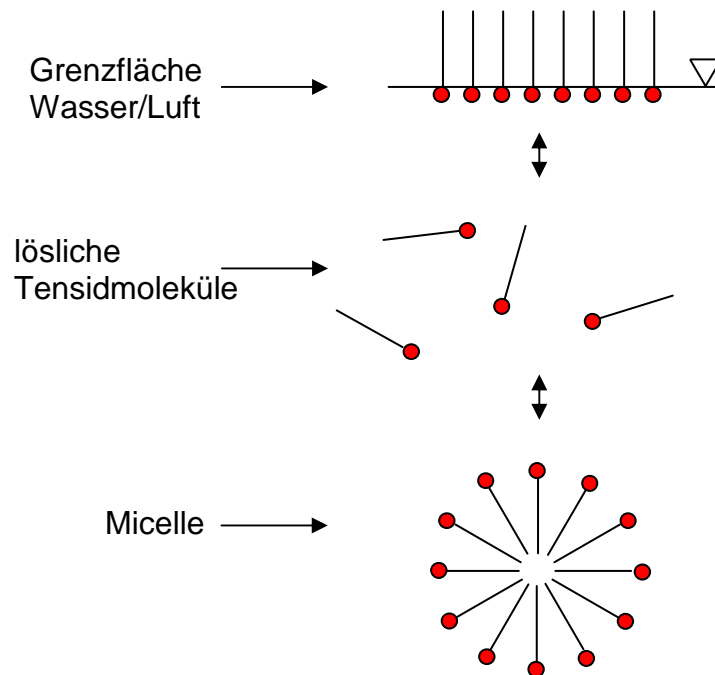


Abb. 1: Verhalten von Tensidmolekülen an Grenzflächen und in wässrigen Lösungen. Zunächst wird an der Wasser-Luft-Grenzfläche eine monomolekulare Tensidschicht ausgebildet. Oberhalb der cmc bilden sich Micellen genannte, geordnete Strukturen.

Zur Herstellung von Tensiden sind in der Vergangenheit vielfältige Methoden entwickelt worden. Zunächst sind sie durch thermische Behandlung pflanzlicher oder tierischer Fette mit Kaliumsalzen hergestellt worden. Durch Erhitzen in Gegenwart von Wasser werden die Fette, die aus Esterverbindungen dreier langkettiger Fettsäuren mit einem Glycerinmolekül bestehen, verseift, so dass die Fettsäuren freigesetzt werden und dann als Kaliumsalze vorliegen. Die Fettsäuren haben durch das Vorhandensein der hydrophilen Carboxylgruppe sowie des hydrophoben Kohlenwasserstoffanteils amphiphilen Charakter und somit eine, wenn auch verhältnismäßig geringe, oberflächenaktive Wirkung. Diese Kaliumsalze von Fettsäuren wurden schon früh als Seife zu Waschzwecken verwendet (Fabry 1991).

Mit der steigenden Nachfrage an Tensiden ging ihre technische Entwicklung einher, so dass heutzutage neue Molekülstrukturen verfügbar sind, die überwiegend aus Mineralölprodukten hergestellt werden und eine wesentlich bessere Waschwirkung bei immer noch hoher Umweltverträglichkeit und Abbaubarkeit aufweisen. Die Frage der Abbaubarkeit ist bei Tensiden von entscheidender Bedeutung, da sie nach ihrer Verwendung als Waschsubstanzen als Abfallprodukt im Abwasser verbleiben. Noch in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden hoch verzweigte Alkylbenzolsulfonate als Waschmittel verwendet, die nur eine geringe Abbaubarkeit zeigen und sich deshalb in der Umwelt anreichern. Diese führten v. a. in aquatischen Umgebungen zu großen Problemen, die sich am offensichtlichsten in Schaumbildung auf Gewässern manifestierten. Die verzweigten Alkylbenzolsulfonate wurden schließlich durch lineare ersetzt, die deutlich besser abbaubar sind, so dass es nicht zu einer Anreicherung in Gewässern kommt. Diese Tenside sind auch heute noch die gebräuchlichsten chemisch synthetisierten Waschmittel petrochemischen Ursprungs (Hauthal 1996).

Eine Alternative zur Verwendung von Erdöl bildet die Synthese von Tensiden aus nachwachsenden Rohstoffen wie Pflanzenölen und Polysacchariden. Daraus können auf chemischem Wege so genannte Alkylpolyglycoside (APG) hergestellt werden (Fabry 1994). Sie bestehen typischerweise aus einem bis vier miteinander verbundenen Zuckermolekülen, an die glycosidisch eine langkettige Kohlenwasserstoffkette gebunden ist. Diese nichtionischen Tenside zeichnen sich durch ihre hohe biologische Abbaubarkeit und geringe Toxizität aus; so können sie in Kläranlagen zu bis zu 99 % abgebaut werden (Eskuchen & Nitsche 1996, Steber et al. 1996).

Neben all diesen chemisch synthetisierten Tensiden gibt es zahlreiche, die von Mikroorganismen hergestellt werden können. Sie zeichnen sich durch vollständige Abbaubarkeit, geringe Toxizität und Herstellbarkeit aus nachwachsenden Rohstoffen aus. Diesen Vorteilen im Vergleich zur chemischen Synthese stehen aber die immer noch hohen Produktionskosten gegenüber, die die praktische Anwendung dieser Biotenside bisher verhindert haben. Im Folgenden sollen zunächst Biotenside allgemein und schließlich einige Biotenside exemplarisch vorgestellt werden.

1.2. Biotenside

In der Natur existieren zahlreiche Verbindungen, die aufgrund ihrer molekularen Struktur einen amphiphilen Charakter aufweisen. Sie kommen in den unterschiedlichsten Reichen von Lebewesen vor und es gibt eine große Variabilität hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, Biosynthese und Funktion. Grundsätzlich kann man sie in fünf verschiedenen Gruppen unterteilen:

- Glycolipide
- Lipoaminosäuren und Lipopeptide
- Polymere Tenside (Lipoproteine, Lipopolysaccharide, u.a.)
- Phospholipide
- Mono- und Diglyceride, Fettsäuren

Die häufigste und am weitesten verbreitete Stoffklasse stellen dabei die Glycolipide dar. Sie bestehen aus monomeren, dimeren oder oligomeren Zuckerverbindungen, an die glycosidisch oder esterförmig eine oder mehrere Fettsäuren gebunden sind. Dabei bildet die Zuckerverbindung den hydrophilen und der Fettsäureanteil den hydrophoben Teil des Tensidmoleküls.

Die Funktionen von Biotensiden in lebenden Systemen können sehr unterschiedlicher Natur sein. So sind sie ein wichtiger Bestandteil der Zellmembranen, in denen v. a. Phospholipide eine wichtige Rolle spielen. Diese weisen zwei hydrophobe Kohlenwasserstoffketten und einen hydrophilen Anteil auf, was ihnen den amphiphilen Charakter verleiht. Je nach der Beschaffenheit des hydrophilen Restes werden sie in Phosphoglyceride (von Triglyceriden abgeleitet) und Sphingomyeline (vom Sphingosin abgeleitet) unterteilt (Lockstoff 1991). Weiterhin tragen Eukaryoten Glycolipide auf ihrer Oberfläche, die wichtige Funktionen bei der Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung ausüben. Sie sind u. a. wichtig bei der Erkennung von Krankheitserregern und bei der Kommunikation mit anderen Zellen, können aber auch als Indikatoren für pathologische Zellveränderungen wie z.B. bei der Tumorgenese dienen (Desai und Banat 1997).

Prokaryoten verwenden Biotenside für sehr unterschiedliche Aufgaben. So ist ihre offensichtlichste Funktion die Erleichterung der Aufnahme hydrophober Substrate (Inoue & Ito 1982, Ito & Inoue 1982, Neu 1996). Viele Mikroorganismen sind dazu in der Lage, neben hydrophilen Kohlenhydratverbindungen so unterschiedliche hydrophobe Substrate wie Pflanzenöle, Wachsester oder langkettige Kohlenwasserstoffverbindungen zu metabolisieren. Diese müssen vor ihrer Degradation für das wässrige Zellsystem verfügbar gemacht werden, was durch Sekretion von Biotensiden oder deren Interaktion mit der Zellmembran geschehen kann. Weiterhin werden Biotenside bei der Interaktion mit Oberflächen verwendet, indem entweder die Stabilität der Bindung zum „Festhalten“ erhöht wird oder durch Destabilisierung vorhandener Bindungen die Desorption erleichtert wird. In diesem Zusammenhang sind auch Vorgänge bei der Bildung von Biofilmen bemerkenswert, in denen Biotenside oder ihre Vorstufen beim so genannten „Quorum sensing“ beteiligt sind (Pamp & Tolker-Nielsen 2007). Durch diese wird die Zahl der vorhandenen Organismen einer Art bestimmt, so dass die Gesamtpopulation sich auf eine bestimmte Art verhält und z.B. einen sessilen Biofilm ausbildet oder Schwarmformen bildet, um sich weiter zu verbreiten. Eine weitere Erklärung für die starke Überproduktion von Biotensiden im limitierten Zustand einer Kultur ist die Verwendung als Speicherstoffe. So werden z.B. unter Stickstoff- und/oder Phosphat- Mangel vorhandene Kohlenstoffsubstrate zu Glycolipiden umgesetzt, um sie Konkurrenten zu entziehen und für den Fall der Beendigung der limitierenden Bedingungen für den eigenen Stoffwechsel verfügbar zu haben. Schließlich haben zahlreiche Publikationen gezeigt, dass Biotenside biologische Wirkungen haben. Diese Effekte können den Organismen, die Biotenside produzieren, Vorteile gegenüber Konkurrenten verschaffen (z. B. Lipopeptide aus *Bacillus subtilis* (Vollenbroich et al. 1997) oder *B. licheniformis* (Fiechter 1992) oder Mannosylerythritolipide aus *Candida antarctica* (Kitamoto et al. 1993)).

Die technische Anwendung von Biotensiden wird zunächst durch ihre zu hohen Herstellungskosten im Vergleich zu chemisch synthetisierten Tensiden limitiert. Diese machen sie für die Verwendung als Bulkprodukte wie z.B. Waschmittel unattraktiv, da APGs hier ähnlich gute Eigenschaften aufweisen. Allerdings gibt es dennoch Versuche, die Eignung von Biotensiden als Reinigungsmittel nachzuweisen (z. B.

Develter & Fleurackers 2010, Develter & Lauryssen 2010). Außerdem haben Biotenside verschiedene Vorteile gegenüber herkömmlichen Tensiden, die sie interessant für Nischenanwendungen machen. So weisen sie - mit gewissen Abweichungen - eine definierte molekulare Zusammensetzung auf, während APGs durch ihren Herstellungsprozess mit hohen Drücken und Temperaturen ein Gemisch sehr vieler unterschiedlicher Molekülstrukturen darstellen. Deshalb ist die Anwendung von Biotensiden besonders im Kosmetik-, Lebensmittel- sowie Umweltbereich von Interesse (Inoue 1988, Desai & Banat 1997, Banat et al. 2000, Mulligan 2005, Mukherjee et al., 2006).

So werden z. B. Sophoroselipide und Saccharose-Laurate mit verschiedenen Acylierungsgraden in Körperpflegemitteln als Feuchtigkeitsspender genutzt (Brown & Cooper 1991, Rybinski & Hill 1998). Auch im Lebensmittelbereich können sie konventionelle Produkte ersetzen (Aulmann & Sterzel 1996), wie man am Beispiel des japanischen Patentes für Mannosylerythritollipide als Backzutat sieht (Akira & Akira, 1997). Darüber hinaus werden Derivate der Glycolipide, nämlich ungewöhnliche Zucker oder optisch aktive Hydroxyfettsäuren, als Aromagrundstoffe verwendet (Lemieux 1953, Lang & Wullbrandt 1999). Schließlich gibt es zahlreiche Versuche, Biotenside zur Reinigung kontaminierter Böden zu verwenden, da hier ihre geringe Toxizität und vollständige Abbaubarkeit entscheidende Kriterien darstellen (u.a. Schippers et al. 2000, Mulligan et al. 2001, Ueno et al. 2006, Vasileva-Tonkova & Gesheva 2007, Whang et al. 2008, Kang et al. 2009)

Auch zur Verwendung als biologisch aktive Wirkstoffe zeigen Biotenside gutes Potential (Singh & Cameotra 2004). Viele von ihnen zeigen antimikrobielle Wirkung, aber auch antivirale und antitumorale Effekte sind beschrieben worden (Haferburg et al. 1987, Lang & Wagner 1993, Rodrigues et al. 2006). Im folgenden Abschnitt soll noch detailliert auf die biologischen Wirkungen von Sophoroselipiden eingegangen werden.

1.3. Sophoroselipide

Sophoroselipide, bekannt seit 1961 (Gorin et al. 1961), können mit der Hefe *Candida bombicola*, früher *Torulopsis bombicola*, fermentativ mit hohen Ausbeuten ($> 300 \text{ g/l}$; Davila et al. 1992, Daniel et al. 1998) hergestellt werden. Das so hergestellte Produkt ist immer eine Mischung aus unterschiedlichen Molekülen, die aber strukturelle Gemeinsamkeiten zeigen (Tulloch et al. 1968). Der polare Anteil der Glycolipide besteht aus Sophorose, einem Disaccharid aus zwei β -1,2-verknüpften Glucose-Molekülen. An dieses ist glycosidisch eine Hydroxyfettsäure gebunden, welche beim größten Teil der Moleküle des Produktgemisches zusätzlich lactonisch an die C4'-Position der Sophorose gebunden ist. Schließlich sind beide Glucosemoleküle teilweise an den 6'- und 6''-Positionen acetyliert. Abb. 2 zeigt die typische Molekülstruktur eines Sophoroselipids, das durch Kultivierung mit *C. bombicola* unter Verwendung von Glucose und Ölsäure gewonnen werden kann.

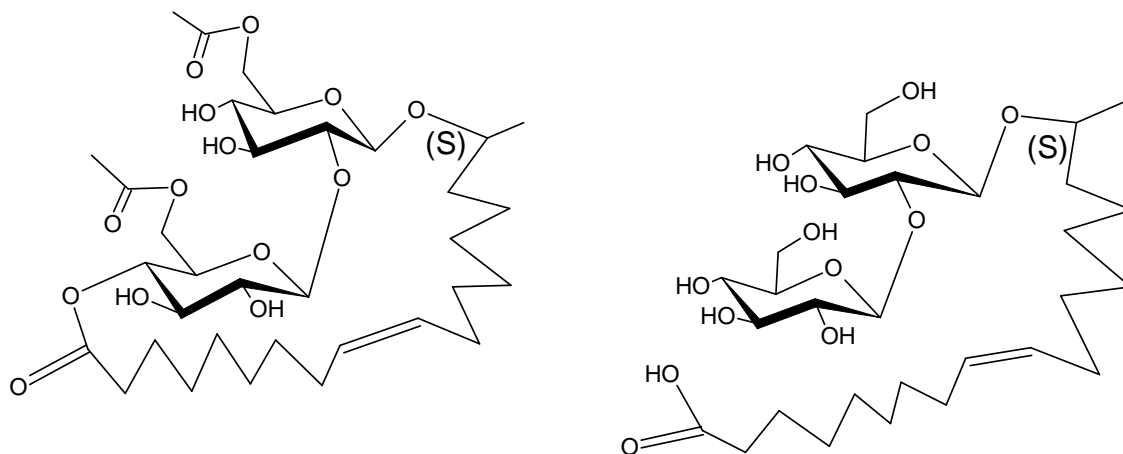


Abb. 2: Strukturformeln zweier Hauptkomponenten von Sophoroselipidgemischen aus Kultivierungen mit *Candida bombicola* auf Glucose und Ölsäure. Links das diacetylierte lactonische Sophoroselipid (vorherrschend), rechts die desacetylierte Säureform.

In (Rau et al. 2001) wird ein Verfahren beschrieben, mit dem in einem semikontinuierlichen Prozess eine hohe volumetrische Produktivität von $2,4 \text{ g/l}\cdot\text{h}$ sowie gute Ausbeute $Y_{P/S}$ von 0,54 erreicht worden sind. Neuere Arbeiten beschäftigen sich hauptsächlich mit der Verwendung unterschiedlicher Substrate wie

z.B. Abfallfetten (Pekin et al. 2005, Fleurackers 2006) oder Melassen (Solaiman et al. 2007; Daverey & Pakshirajan 2008).

Neben diesen „klassischen“ Sophoroselipiden können mit *C. bombicola* so genannte Alkylsophoroside hergestellt werden, in denen an die Sophorose ein mittelkettiger Fettalkohol geknüpft ist (Abb. 3, Brakemeier et al. 1995). Diese haben im Vergleich zu klassischen Sophoroselipiden bessere Oberflächenaktivitäten und können die Oberflächenspannung von Wasser auf 31 mN/m senken. Sie werden beim Wachstum von *C. bombicola* auf Zuckern und mittelkettigen Alkoholen (C₁₂) gebildet.

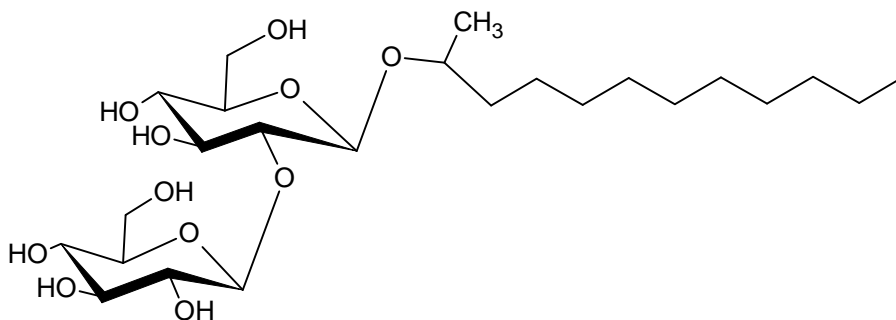


Abb. 3: Strukturformel eines Alkylsophorosids aus Kultivierungen mit *Candida bombicola* mit Glucose und 2-Dodecanol.

Fermentative Gemische aus Sophoroselipiden können die Oberflächenspannung von Wasser auf 35 mN/m (Otto et al. 1999) senken, wodurch sie sich für einen Einsatz als Schaumverstärker, Emulgatoren und Stabilisatoren eignen (Haferburg et al. 1986, Willumsen & Karlson 1997, van Bogaert et al. 2007 a, Nguyen & Sabatini 2009). Außerdem wurde ihre gute Eignung als komplett biologisch abbaubares und wenig toxisches Reinigungsmittel gezeigt (Develter & Laryssen 2010). Es konnten auch biologische Aktivitäten wie z.B. inhibitorische Effekte gegen Proteinkinase C in HL60 Leukämie-Zelllinien (Isoda et al. 1997) sowie Induktion der Zelldifferenzierung in diesen Zelllinien (Scholz et al. 1998), Wirkung gegen HIV und Immobilisierung von Spermien (Shah et al. 2005) oder gute Eigenschaften zur Behandlung von Sepsis (Bluth et al. 2006) sowie Wirkung gegen Pankreas-Tumorzellen (Fu et al. 2008) nachgewiesen werden.

In jüngster Zeit wurden schließlich Werkzeuge zur genetischen Veränderung von *C. bombicola* entwickelt. So konnte mit *URA3* ein Markergen gefunden werden (van Bogaert et al. 2007 b), mit dessen Hilfe ein System zur Transformation und

Selektion von *C. bombicola* entwickelt werden konnte (van Bogaert et al. 2008a). Das erlaubte das Auffinden und die Charakterisierung mehrerer an der Biosynthese von Sophoroselipiden beteiligten Gene und Enzyme, nämlich des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase (van Bogaert et al. 2008b), des an der β -Oxidation beteiligten Gens *MFE-2* (van Bogaert et al. 2009a) sowie dreier Cytochrom P450-Monooxygenasen (van Bogaert et al. 2009b). Des Weiteren konnte der Fettsäure-Synthase-Komplex durch Zugabe von Cerulenin gezielt inhibiert werden, so dass keine de-novo- Fettsäuresynthese mehr stattfinden konnte. Dadurch konnte das Spektrum an produzierten Sophoroselipiden verkleinert und somit eine definiertere Produktsynthese ermöglicht werden (van Bogaert et al. 2008c). Ähnliches konnte durch Kultivierung eines Stammes erreicht werden, der nicht zur β -Oxidation in der Lage ist (Fleurackers et al. 2010).

Inzwischen wurden weitere Organismen gefunden, die in der Lage sind, Sophoroselipide zu produzieren: aus öbelastetem Abwasser wurde die Hefe *Wickerhamiella domercqiae* isoliert und ihre Produkte hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und biologischen Eigenschaften charakterisiert (Chen et al. 2006). Weiterhin wurde eine thermophile Hefe, *Pichia anomala*, aus fermentierten Lebensmitteln isoliert, die geringe Mengen Sophoroselipide mit Lipidkomponenten der Kettenlängen C₁₈ und C₂₀ produziert (Thaniyavarn et al. 2008).

1.4. Verschiedene andere Glycolipide

Aufgrund ihrer interessanten technischen Potentiale wurde schon kurz nach ihrer Entdeckung versucht, auch andere Biotenside außer den Sophoroselipiden in technisch relevanten Mengen herzustellen. Dabei sind vor allem zwei Verfahren hervorzuheben: die Produktion von Mannosylerythritollipiden (MEL) mit *Pseudozyma aphidis* sowie von Rhamnoselipiden (RL) mit *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4.1. Mannosylerythritolipide

MELs wurden zunächst 1956 bei *Ustilago maydis* (Boothroyd et al., 1956) entdeckt. Später wurden sie auch bei dem Stamm *Candida antarctica* gefunden, der zu *Pseudozyma antarctica* umbenannt wurde, sowie bei zahlreichen anderen *Pseudozyma*-Stämmen. Sie bestehen aus einem Mannose-Molekül, an das an der C1-Position glycosidisch ein Molekül Erythrit gebunden ist. An den Positionen C2 und C3 sind Fettsäuren variabler Kettenlängen im Bereich von sechs bis achtzehn C-Atomen gebunden. Die Positionen C4 und C6 sind variabel mit Acetylgruppen verestert, so dass Variationen des MEL-Moleküls entstehen, die als MEL A-D bezeichnet werden (Kitamoto et al. 1990, s. Abb. 4).

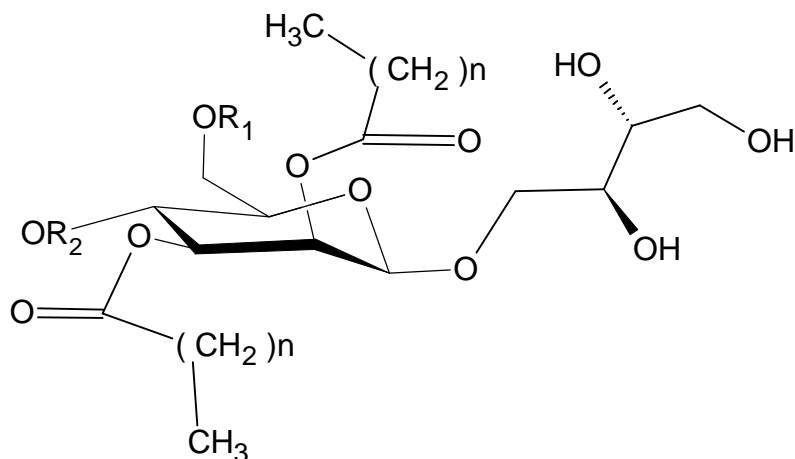


Abb. 4: Beispielstruktur von Mannosylerythritolipiden aus *Pseudozyma aphidis*. MEL A: $R_1 = R_2 =$ Acetyl; MEL B: $R_1 =$ Acetyl, $R_2 = H$; MEL C: $R_1 = H$, $R_2 =$ Acetyl. $n = 6 - 10$; MEL D: $R_1 = R_2 = H$.

Erst kürzlich sind zahlreiche weitere Spezies der Gattung *Pseudozyma* entdeckt worden, die MELs mit ähnlichem molekularen Aufbau sekretieren (Konishi et al. 2007 a, Morita et al. 2007, Fukuoka et al. 2007). Darüber hinaus konnten sowohl die Produktion von MELs mit *P. aphidis* im Bioreaktor als auch ihre Aufarbeitung deutlich verbessert werden (Rau et al. 2005 a, Rau et al. 2005 b, Rau et al. 2005 c).

MELs weisen als amphiphile Moleküle Oberflächenaktivität auf; so reduzieren angereicherten Glycolipide die Oberflächenspannung von Wasser auf 28 mN/m, die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und n-Tetradecan von 43 mN/m auf 2 mN/m (Kitamoto et al. 1993). Sie binden an humane Antikörper (Im et al. 2003, Imura et al.

2007, Ito et al. 2007) und an Lektine (Konishi et al. 2007 b) und können so mit der Oberfläche eukaryotischer Zellen interagieren.

1.4.2. Rhamnoselipide

Rhamnoselipide konnten bei *Pseudomonas aeruginosa* erstmals 1949 gefunden werden (Jarvis & Johnson 1949). Bei ihnen handelt es sich um anionische Glycolipide, die sich aus jeweils einem oder zwei 1,2-glycosidisch verknüpften Rhamnose-Molekülen zusammensetzen, an die an der freien C1-Position ein oder zwei Moleküle β -Hydroxy-Decansäure glycosidisch gebunden sind (RL 1-4, s. Abb. 5). Die genaue Zusammensetzung der RL-Gemische ist stark abhängig von den verwendeten Substraten und Kultivierungsbedingungen.

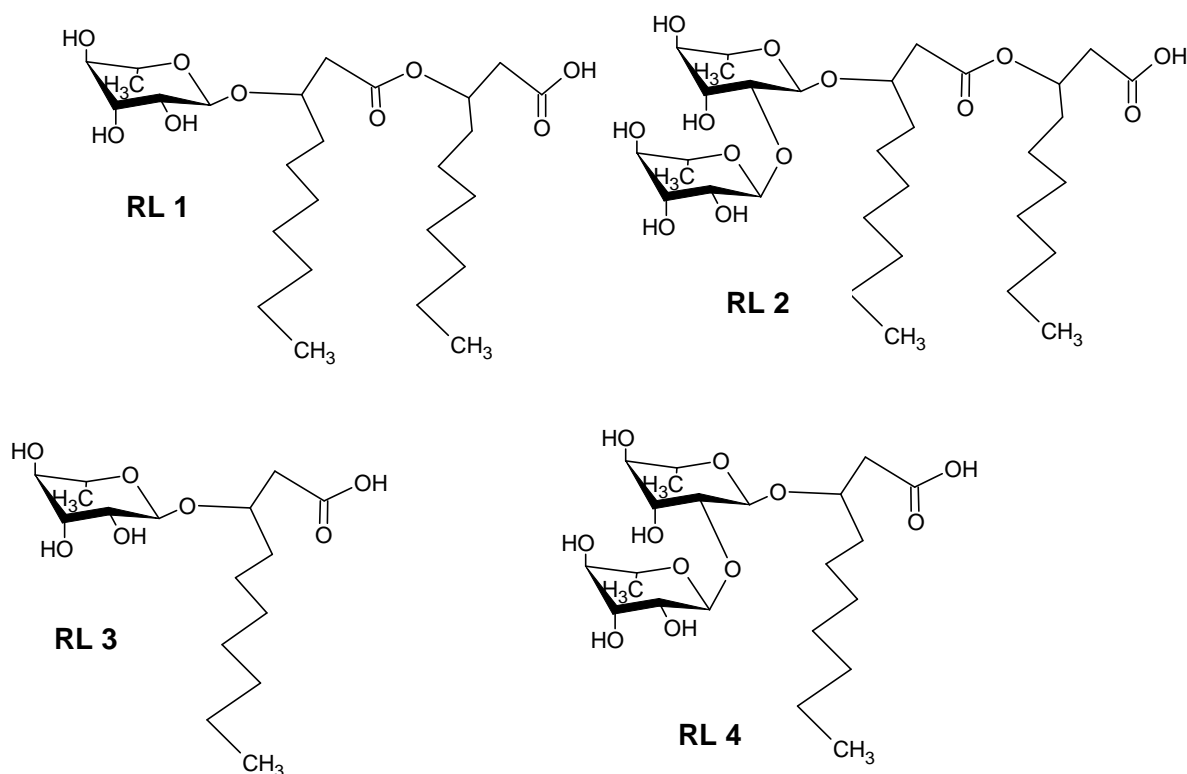


Abb. 5: Strukturen der Rhamnoselipide von *Pseudomonas aeruginosa*.

Inzwischen wurden verschiedene Spezies der Gattung *Pseudomonas* gefunden, die Rhamnoselipide herstellen (u.a. Bergström et al. 1946, Tuleva et al. 2002, Gunther et al. 2005, Gunther et al. 2006, Monteiro et al. 2007). Generell werden große Mengen

RL bei der Verwendung von Pflanzenölen als Substrate für *P. aeruginosa* produziert (u. a. Linhardt et al. 1989, Sim et al. 1997, Lang & Wullbrandt 1999). Die höchsten RL-Konzentrationen konnten mit über 100 g/l bei Kultivierungen unter Verwendung von ruhenden Zellen mit Sojaöl als C-Substrat erzielt werden (Giani et al. 1997). Allerdings wurden auch zahlreiche andere Stoffe wie Ethanol oder Abfallfette auf ihre Eignung als C-Substrate für die RL-Produktion untersucht (Matsufuji et al. 1997, Haba et al. 2000, Raza et al. 2007).

Rhamnoselipide zeigen sehr gute ober- und grenzflächenaktive Eigenschaften. RL 1 und RL 2 sind in der Lage, die Oberflächenspannung von Wasser auf 25 mN/m zu reduzieren (Parra et al. 1989). Da sie außerdem eine geringe Toxizität aufweisen, wird ihnen das vielleicht größte Potential aller Glycolipide zur industriellen Anwendung zugesprochen (Maier & Soberon-Chavez 2000, Nitscke et al. 2005). Ein Hindernis dafür ist die Pathogenität des Produzenten *P. aeruginosa*, der verschiedene Krankheiten, v. a. bei immunsupprimierten Menschen verursacht. Deshalb wurde schon früh versucht, die bei der Herstellung von RL beteiligten Gene in nicht-pathogenen Wirten heterolog zu exprimieren (Ochsner et al. 1995). Dieser Ansatz war wenig erfolgreich, mit *E. coli* konnten so gerade einmal 0,02 g/l RL produziert werden. Allerdings wird auch in aktuellen Arbeiten versucht, mit Metabolic-Engineering-Ansätzen die Ausbeute in *E. coli*-Systemen zu verbessern (Cabrera-Valladares et al. 2006).

Gerade in jüngerer Zeit ist die Tatsache ins Zentrum des Interesses gerückt, dass RL und die bei ihrer Synthese beteiligten Gene eine wichtige Rolle beim Entstehen von *P. aeruginosa*-Biofilmen spielen (Lequette and Greenberg 2005). An diesem Prozess sind quorum-sensing-Aktivitäten beteiligt, also Vorgänge, die durch molekulare Zellkommunikation die Populationsdichte bestimmen (Ochsner & Reiser 1995). Diese kontrollieren die Aktivität des *rhlAB*-Operons (Pearson et al. 1997), das die Strukturgene zur Produktion von RL enthält. RL wiederum sind für die Ausprägung einer pilzartigen Organisationsstruktur der *P. aeruginosa*-Zellen innerhalb des Biofilms verantwortlich (Davies et al. 1998). Hierdurch wird deutlich, dass RL wichtige biologische Funktionen haben, die über bloße Oberflächenaktivitäten weit hinausgehen. So können RL beispielsweise zur Wundheilung (Stipcevic et al. 2006) oder zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten (Sharma et al. 2007) eingesetzt

werden, spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der Verteidigung bakterieller Biofilme gegen das Wirtsimmunsystem durch Abtöten von dessen Leukozyten (Jensen et al. 2007).

1.4.3. Weitere zuckerbasierte Biotenside

Neben den oben genannten Biotensiden, die das Thema einer Reihe internationaler Forschungsbemühungen sind, existieren zahlreiche weitere, die weniger stark im Zentrum allgemeiner Aufmerksamkeit stehen, aber dennoch interessante Eigenschaften zeigen. Von diesen sollen hier einige wenige kurz erläutert werden.

1.4.3.1. Marine Glycoglycerolipide

Mit Hilfe eines marinen Bakteriums der Gattung *Microbacterium*, das aus dem Schwamm *Halichondria panicea* isoliert worden war, konnten neuartige mannosehaltige Glycoglycerolipide gewonnen werden (Wicke et al. 2000). Später gelang es, ihre Produktion zu verbessern, so dass im Reaktormaßstab ca. 500 mg/l produziert werden konnten (Lang et al. 2004). Für diese Glycoglycerolipide konnten gute oberflächenaktive und biologisch wirksame Eigenschaften festgestellt werden, die durch enzymatische Modifikation sogar noch verbessert werden konnten. Ebenfalls aus einem Schwamm konnte das Bakterium *Bacillus pumilus* AAS3 isoliert werden, das ein neuartiges Diglucosyl-Glycerolipid produziert (Ramm et al. 2004). In (Hölzl & Dörmann 2007) ist eine gute Übersicht über verschiedene weitere Glycoglycerolipide bakteriellen und pflanzlichen Ursprungs enthalten.

1.4.3.2. Oligosaccharidlipide aus *Tsukamurella spec.*

Aus Bodenproben konnte ein Bakterium der Gattung *Tsukamurella* isoliert werden, das interessante oberflächenaktive Moleküle produziert (Vollbrecht et al. 1998, Vollbrecht et al. 1999, s. Abb. 6). Diese Di- und Oligosaccharide bestehen aus Trehalose bzw. Sophorose und jeweils einem damit verknüpften Molekül Glucose

bzw. Galactose. An dieses Kohlenhydratgrundgerüst sind einfache Fettsäuren mit Kettenlängen von sechs bis zu 18 C-Atomen gebunden.

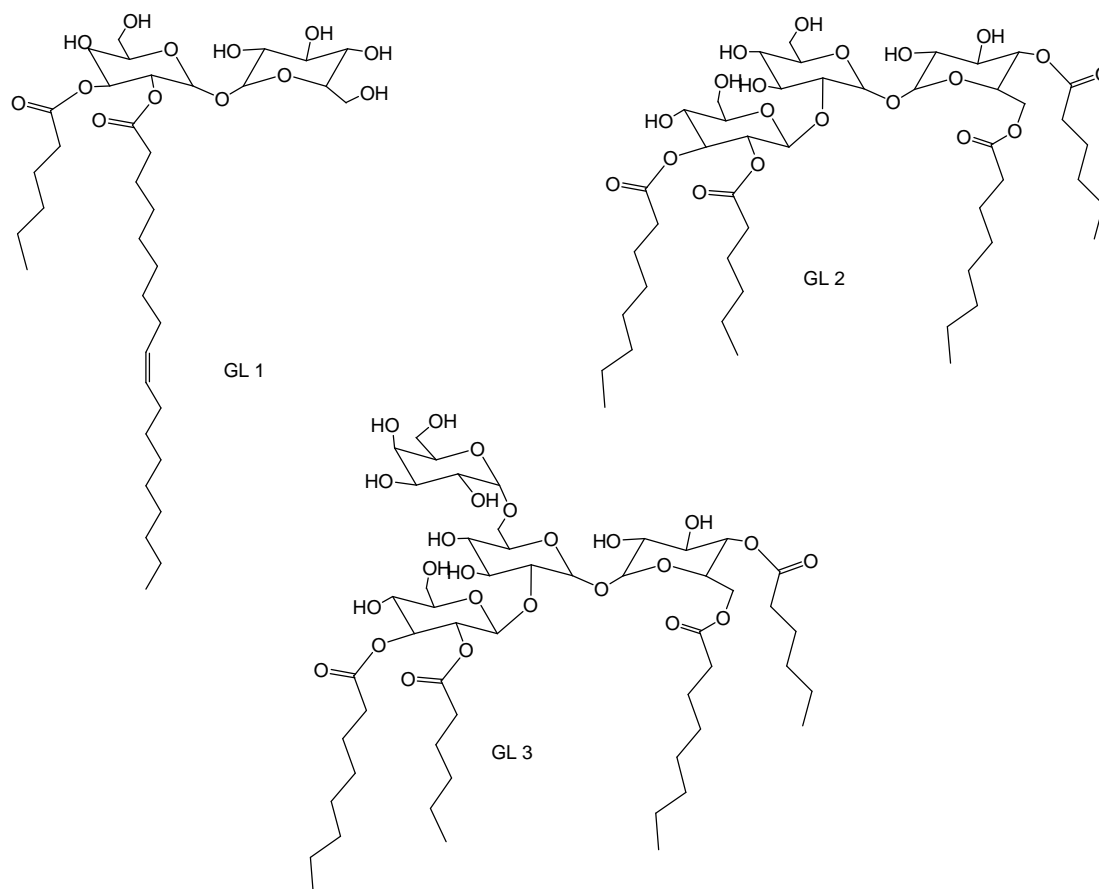


Abb. 6: Gemisch aus verschiedenen Di- u. Oligosaccharidlipiden, das bei der Kultivierung von *Tsukamurella* spec. gebildet wird. Die genaue Zusammensetzung variiert mit den Kultivierungsbedingungen.

Fermentativ werden immer Gemische der einzelnen Molekültypen hergestellt. Durch Verfahrensoptimierung konnte die Konzentration dieser Oligosaccharidlipide auf 22 g/l gesteigert werden. Weiterhin konnte durch Verwendung des ungewöhnlich aufgebauten Calendulaöls die Zusammensetzung des Produktgemisches deutlich beeinflusst werden. *Tsukamurella*-Glycolipide weisen gute oberflächenaktive und biologisch wirksame Eigenschaften auf, beispielsweise die Inhibierung des frühen Anitgens des Eppstein-Barr-Virus. Durch chemo-enzymatische Modifikation einzelner Molekül-Spezies konnten Derivate hergestellt werden, die verbesserte biologische Eigenschaften aufweisen (Langer et al. 2006).

1.5. Bioprozesse mit integrierter Zellrückhaltung

Die Integration von Aufarbeitungsverfahren in einen Bioproduktionsprozess dient zur Erhöhung der Zelldichte, der Vermeidung eventueller Produktinhibierung oder Akkumulation toxischer Substanzen, der Vermeidung des Produktabbaus sowie der Vereinfachung der Aufarbeitung (Takors 2004). Nachteile können die erhöhte Anlagenkomplexität inkl. erhöhter Investitionskosten, erhöhte Kontaminationsgefahr sowie sicherheitstechnische Probleme sein. Dazu wird das entstandene Produkt durch verfahrenstechnische Schritte noch während des Produktionsprozesses von den verwendeten Biokatalysatoren bzw. Zellen getrennt. Dazu werden die zur Abtrennung erforderlichen konstruktiven Elemente entweder in den Prozessraum selber integriert (z.B. Membranreaktoren), oder ein Teil des Produktionsmediums wird durch einen externen Kreislauf geführt, in dem Produkt enthaltendes Medium aus dem Prozess entfernt und die Zellen zurückgehalten werden.

Verfahren mit integrierter Produktabtrennung werden schon seit längerem im industriellen Maßstab angewendet. Beispiele sind die Produktion rekombinanter Proteine mit der Hefe *Pichia pastoris* (Cornelissen et al. 2003) oder organischer Säuren (Pai et al. 2002, Richter & Nottelmann 2004). So wurden aber auch schon Verfahren beschrieben, in denen die mikrobielle Produktion von Biotensiden mit einem integrierten Verfahren durchgeführt wurde. Dazu wurde zum Ersten die kontinuierliche Produktion von Rhamnoselipiden mit freien *P. aeruginosa*-Zellen (Guerra-Santos et al 1984, Guerra-Santos et al 1986, Reiling et al 1986) so verbessert, dass das Produkt durch einen zweistufigen Filtrationsprozess entfernt wurde, der extern im Kreislauf geführt wurde (Gruber et al. 1993). Die erste Filtrationsstufe diente dabei lediglich dem Strippen des produzierten CO₂ und der Anreicherung mit Sauerstoff, so dass Schaumbildungsprobleme behoben und dem hohen Sauerstoffbedarf begegnet werden konnte. Der zweite Filtrationsschritt diente schließlich der Zellabtrennung. Die dabei erzielten Produktivitäten und Ausbeuten von 0,545 g/(l·h) und 0,15 g_{Produkt} / g_{Substrat} konnten später noch gesteigert werden (Ochsner et al. 1996) auf 2 g/(l·h) bzw. 0,48 g_{Produkt} / g_{Substrat}. Der gleiche Prozess wurde auch für die Produktion von Rhamnoselipiden mit *Pseudomonas fluorescens* verwendet, wodurch 545 mg/h produziert werden konnten (Fiechter 1992).

Zum integrierten und postproduktionalen Downstream-Processing sollten im Rahmen dieser Arbeit Ultraschalltrennung und Membranfiltration als Verfahren verwendet werden. Deshalb werden diese in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

1.5.1. Ultraschalltrennung

Ein bedeutender Teil aller biotechnologischen Produktionsprozesse ist die Aufarbeitung des hergestellten Stoffes, das so genannte downstream processing (DSP). Ein entscheidender Schritt dabei ist die Abtrennung der Zellen, die zur Produktion verwendet werden, vom Überstand. Dazu werden oft Sedimentations- und Zentrifugationsschritte durchgeführt, aber auch Filtration findet hier Anwendung. Ein eher junges Separationsverfahren stellt die sog. Ultraschallseparation dar. Sie beruht auf Kräften, die auf suspendierte Partikel in stehenden Ultraschallfeldern (Abb. 7) wirken, den so genannten Strahlungskräften (Kundt & Lehmann 1874). Diese werden durch den räumlichen Druckgradienten hervorgerufen, der durch die Schallwellen an suspendierten Partikeln verursacht wird. Diese Kräfte bewirken, dass suspendierte Partikeln zu den Antiknotenebenen des stehenden akustischen Feldes bewegt werden (Abb. 8), wo sie anschließend agglomerieren.

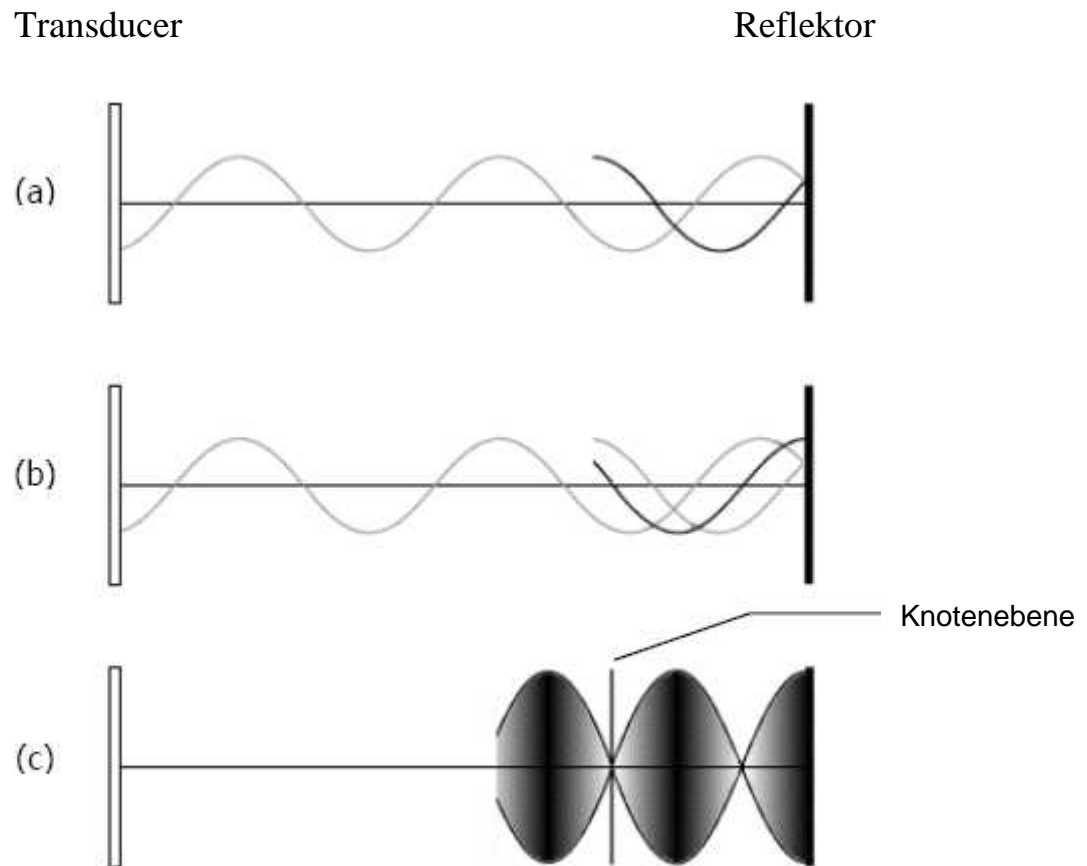


Abb. 7: Stehende Welle, gebildet aus der Überlagerung einer fortschreitenden Welle und ihrer Reflexion (a). Die Überlagerung wird stationär (b). Die Amplitudenverteilung wird „Einhüllende“ genannt (c). Aus: Radel 2002

Wählt man den apparativen Aufbau eines Ultraschalltrenngerätes nach geeigneten Gesichtspunkten, so kann man sich das Schwerkraftfeld der Erde nutzbar machen, so dass die agglomerierten Partikel absinken. Diese Anordnung wählt man, um ein so genanntes „Ultrasonically Enhanced Settling“ (UES) durchzuführen (Abb. 9). Dabei werden zunächst homogen suspendierte Partikel durch Strahlungskräfte in einem stehenden Ultraschallfeld in dessen Antiknotenebenen bewegt. Dort agglomerieren sie weiter durch transverse Strahlungskräfte. Da es sich bei dem angelegten stehenden Ultraschallfeld um ein Feld mit mehreren Schwingungsamplituden innerhalb der Trennkammer handelt, findet der Vorgang an mehreren Knotenebenen statt, so dass sich mehrere parallel zueinander verlaufende Partikelebenen ausbilden. Durch die

darauf einwirkende Schwerkraft sinken die Agglomerate schließlich zu Boden der Trennkammer.

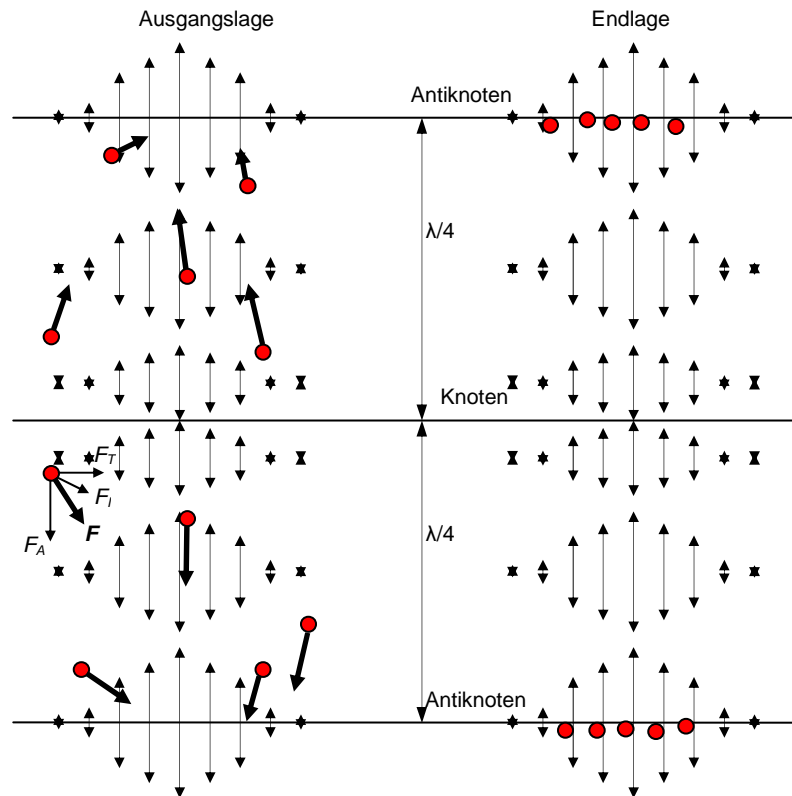


Abb. 8: Agglomeration suspendierter Partikeln in einem stehenden akustischen Feld. Zunächst werden die Partikel durch Strahlungskräfte in die Antiknotenebenen geschoben. Dort wirken weitere Kräfte in Richtung der Amplitudenmaxima, so dass es dort zur Aggregation kommt.

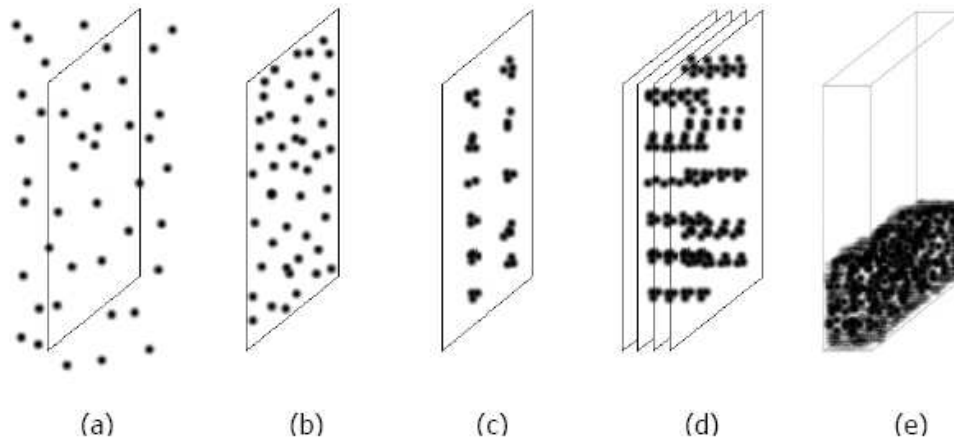


Abb. 9: Phasen des UES: gleichmäßig verteilte Partikel (a) werden durch Strahlungskräfte in die Antiknotenebenen gedrängt (b). Transverse Strahlungskräfte konzentrieren sie dort weiter auf (c). Dieser Vorgang findet an allen Knotenebenen des stehenden Feldes parallel statt (d). Schließlich sinken die Agglomerate aufgrund der Schwerkraft zu Boden. Aus: Radel 2002

Der Einfluss der Schwerkraft kann dabei mit dem Stokes-Gesetz für die Sinkgeschwindigkeit von Partikeln berücksichtigt werden:

$$v_S = \frac{d_P^2 \cdot \Delta\rho \cdot g}{18 \cdot \eta} \quad (1) \quad \text{mit} \quad \begin{array}{ll} v_S & = \text{Sinkgeschwindigkeit} \\ d_P & = \text{Partikeldurchmesser} \\ \Delta\rho & = \text{Dichtedifferenz zwischen Zelle und Medium} \\ g & = \text{Beschleunigungskonstante} \\ \eta & = \text{dynamische Viskosität} \end{array}$$

Aus Gl. 1 geht hervor, dass die Sinkgeschwindigkeit der Partikeln im Ultraschallfeld proportional ist zum Quadrat des Partikeldurchmessers. Deshalb hat eine Agglomeration der Partikel durch die wirkenden Strahlungskräfte eine Zunahme des Partikeldurchmessers und somit eine starke Zunahme der Sinkgeschwindigkeit zu Folge.

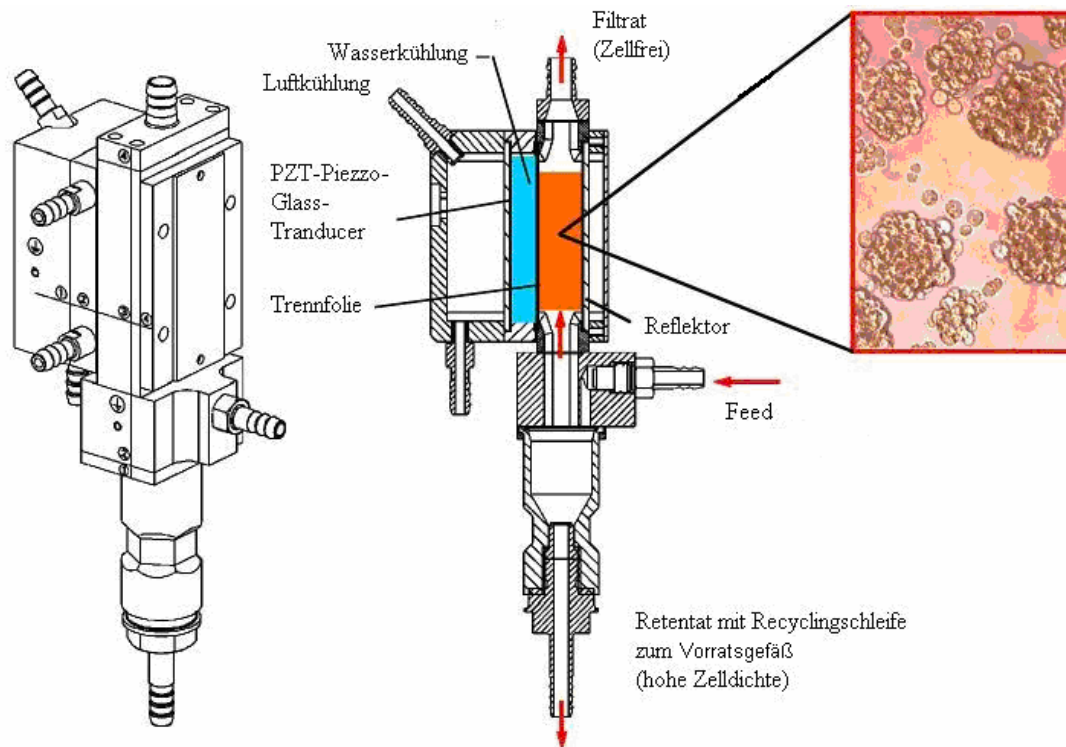


Abb. 10: Akustisches Zell-Rückhaltungssystem für Bioreaktoren. Der Bereich, in dem das stehende Ultraschallfeld sich ausbildet, besteht aus zwei Kammern: Wasserkühlung und Trennbereich. Der Feed-Strom teilt sich auf in einen zellarmen Filtrat- und einen aufkonzentrierten Retentat-Strom.

Der apparative Aufbau eines UES-Gerätes ist in Abb. 10 dargestellt. Das zellhaltige Medium („Feed“) strömt in die Trennkammer, in der ein stehendes Ultraschallfeld anliegt. Da dieses sich auch durch die Kammer erstreckt, in der die Wasserkühlung stattfindet, spricht man von einem Zweikammer-System. Der Feed-Strom teilt sich nun auf in einen Filtrat- und einen Retentat-Strom. Da die Zellen in der Trennkammer zurückgehalten werden und nach unten sinken, sollte der Filtratstrom nahezu zellfrei sein, im Retentat-Strom hingegen werden die Zellen aufkonzentriert. Eine vollständige Zellabtrennung, d. h. eine Trennleistung von 100 %, kann durch UES nicht erreicht werden (Gröschl 1998). Die Trennleistung ist dabei definiert zu (Gl. 2):

$$TL = 100 \% \cdot \left[1 - \frac{C_{Fi}}{C_{Feed}} \right] \quad (2)$$

TL = Trennleistung

C_{Fi} = Zellkonzentration im Filtrat

C_{Feed} = Zellkonzentration im Feed

Der Einfluss von Ultraschallfeldern auf Hefezellen der Art *Saccharomyces cerevisiae* wurde bereits ausführlich untersucht im Hinblick auf deren Unversehrtheit, Morphologie, Überlebensfähigkeit und Reproduktionsfähigkeit (Radel et al. 2000). Dabei wurden auch mikroskopische Untersuchungen der Zellagglomerate durchgeführt, die bei der Ultraschalltrennung entstehen (Gherardini et al. 2002, Gherardini et al. 2005). Darüber hinaus wurden Versuche durchgeführt, UES in biotechnologische Prozesse zu integrieren. Dabei wurden eukaryotische Zellen verwendet, nämlich CHO-Zellen (Ryll et al. 2000, Gorenflo et al. 2002), Hybridoma-Zelllinien (Pui et al. 1995, Bierau et al. 1998, Gröschl et al. 1998, Dalm et al. 2005) sowie Insektenzellen (Zhang et al. 1998). Diese Versuche waren sowohl im Hinblick auf die Trennleistung als auch auf die Überlebensfähigkeit der verwendeten Zellkulturen Erfolg versprechend.

1.5.2. Membranfiltration

Neben der eher neuartigen Ultraschallabtrennung mit UES sollte ein etabliertes Verfahren der Zellabtrennung mit *C. bombicola*-Systemen untersucht werden, nämlich die Membranfiltration (Chmiel 2006). Da Kultivierungssuspensionen von *C. bombicola* während der Produktion von SL hohe Viskositäten erreichen, wurde eine Dead-End-Filtration von vornherein ausgeschlossen und stattdessen ein Querstromfiltrationsansatz gewählt. Dabei wird die zu filtrierende Flüssigkeit mit hohem Druck durch Hohlfasermembranen definierter Porengröße geleitet. Durch das Erzeugen einer hohen Strömungsgeschwindigkeit in den Hohlfasern verhindert man die Ablagerung von Feststoffpartikeln an der Membran und somit das Verstopfen der Filtermembran. Dadurch soll ein nahezu konstanter Transmembranfluss erreicht werden. Die treibende Kraft hierbei ist der Transmembrandruck zwischen Innen- und Außenseite der Hohlfasermembran. Die Trennung der Feststoffe erfolgt rein mechanisch nach dem Prinzip des Größenausschluss, d.h. dass alle Partikel mit einem größeren Durchmesser als dem Durchmesser der Membranporen zurückgehalten werden.

Dabei sollten sowohl Mikro- als auch Ultrafiltration verwendet werden. Diese unterscheiden sich durch die Porengrößen der verwendeten Membranen. Von Mikrofiltration spricht man bei Porengrößen bis von 0,5 - 0,1 μm , zur Ultrafiltration werden Poren der Größen 0,1 - 0,01 μm verwendet. Bei der Ultrafiltration werden die Porengrößen ebenfalls oft angegeben durch die Ausschlussgrenze in Form der Molekülmasse eines globulären Moleküls, welches die Membran nicht durchdringen kann. Dies wird als „Nominal Molecular Weight Cut-Off“ (NMWC) mit der Einheit Dalton bzw. gebräuchlicher kiloDalton (D bzw. kD) bezeichnet.

1.6. Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten neue Co-Substrate gefunden werden, mit denen die Herstellung von Sophoroselipiden mit dem Stamm *Candida bombicola* ATCC 22214 bessere Ausbeuten oder andersartige Produktzusammensetzungen ergibt.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag aber auf der Produktion von Sophoroselipiden mit *C. bombicola* unter Verwendung innovativer Verfahren wie Ultraschallseparation sowie Mikro- und Ultrafiltration zur Vereinfachung des DSP. Dazu war es nötig, zunächst die Trennmethode für *C. bombicola* zu untersuchen und zu charakterisieren. Anschließend sollte die Ultraschalltrennung in einen fermentativen Produktionsprozess integriert werden. Dazu sollte dieser zunächst durch unterschiedliche Feed-Techniken optimiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. *Mikroorganismus*

Die nachfolgend beschriebenen Kultivierungen wurden mit der von der American Type Culture Collection, Rockville/USA, bezogenen Hefe *Candida bombicola* ATCC 22214 (Spencer et al. 1970) durchgeführt.

2.2. *Chemikalien*

Es wurden Chemikalien folgender Bezugsquellen verwendet:

Glucose · H ₂ O	Cerestar Deutschland GmbH, Krefeld
YM-Agar	Difco Laboratories, Detroit USA
Hefe-Extrakt	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
Natriumcitrat · 3 H ₂ O	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
NH ₄ Cl	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
KH ₂ PO ₄	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
NaCl	Roth GmbH & Co., Karlsruhe
KCl	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
Erukasäure	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
n-Hexadekan	Sigma Chemical Co., St. Louis USA
Ölsäure	Henkel KgaA, Düsseldorf
Rapsöl erukasäurereich	Henkel KgaA, Düsseldorf
Rapsöl erukasäurearm	Henkel KgaA, Düsseldorf
D-Saccharose	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
D-Sachharose, technisch	Nordzucker AG, Braunschweig

Dieselöl	Aral AG, Bochum
Senföl	Henry Lamotte GmbH, Bremen
Speziol 936U	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
2-Ethyl-1-Hexanol	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
Mihagol-S	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
Rilanit G-16	Cognis GmbH, Düsseldorf
Sonnenblumenöl	Henkel KgaA, Düsseldorf
Calendulaöl	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
2-Tetradecanol	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
2-Dodecanol	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
Propidiumiodid	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
Fluoresceindiacetat	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
α -Naphthol	Sigma Chemical Co., St. Louis USA
Aceton	Riedel-de Häen, Seelze
Agar Agar	Serva, Heidelberg
Anisaldehyd	Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz
Chloroform	Riedel-de Häen, Seelze
Dichlormethan	Acros organics, Geel Belgien
Eisessig	Riedel-de Häen, Seelze
Ethanol	Riedel-de Häen, Seelze
Methanol	Roth GmbH & Co., Karlsruhe
tert-Butylmethylester	Riedel-de Häen, Seelze
n-Hexan	Riedel-de Häen, Seelze
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Bei den verwendeten Substraten Ölsäure, Senföl, Dieselöl, Rapsöl, Calendulaöl und Sonnenblumenöl handelt es sich nicht um Reinchemikalien; ihre Zusammensetzung wird in Tab. 1 gezeigt. Mihagol-S ist eine technische Mischung von n-Alkanen (6.3 % n-C10, 76 % n-C14, 11.3 % n-C15, 6.3 % n-C16). Rilanit G-16 (oder auch Eutanol G-16) ist eine Herstellerbezeichnung für 2-Hexyldecanol-1. Speziol 936U ist eine Herstellerbezeichnung für Isooleyalkohol. Hauptbestandteil

des Calendulaöls ist mit 55-60% die Calendulasäure (C 18:3, $\Delta^{8,10,12}$). Dieselöl ist eine komplexe Kombination von Kohlenwasserstoffen, hergestellt durch Rohöldestillation, und besteht aus Kohlenwasserstoffen mit Kohlenstoffzahlen vorherrschend im Bereich von C-11 bis C-25.

Tab. 1: Zusammensetzung von Sonnenblumenöl, Senföl und Rapsöl

Fettsäure		Sonnenblumenöl [%]	Senföl [%]	Rapsöl [%]	Ölsäure [%]
< Myristinsäure	(C14:0)				0,3
Myristinsäure	(C14:0)				2,4
Pentadecansäure	(C15:0)				0,6
Palmitinsäure	(C16:0)	4,2	2,7	4,3	4,6
Palmitoleinsäure	(C16:1)				5,2
Margarinsäure	(C17:0)				1,6
Stearinsäure	(C18:0)	4,3	1,4	1,6	1,4
Ölsäure	(C18:1)	82,3	20,3	58,3	67,4
Linolsäure	(C18:2)	7,7	7,6	19,4	12,3
Linolensäure	(C18:3)		9,1	9,7	1,2
Nonadecansäure	(C19:0)				1,8
Arachidonsäure	(C20:0)		11,5	1,3	
Behensäure	(C22:0)				
Erukasäure	(C22:1)		38,5		

2.3. Nährmedien

Die Bestandteile der Nährmedien wurden in destilliertem Wasser gelöst und anschließend 20 min bei 121°C autoklaviert. Ebenso erfolgte die Sterilisation der hydrophoben Kohlenstoffquellen in separaten Gefäßen.

2.3.1. Vorkulturmedium (nach Fiehler 1994)

Glucose · H ₂ O	100,00 g
Hefe-Extrakt	4,00 g
Natriumcitrat-Trihydrat	5,00 g
NH ₄ Cl	1,54 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,70 g
NaCl	0,50 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,27 g
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	0,16 g
dest. H ₂ O	1000 ml

Der pH-Wert wird vor dem Sterilisieren auf 6,0 eingestellt.

2.3.2. Hauptkulturmedium

Das Hauptkulturmedium entspricht dem Vorkulturmedium. Die hydrophoben Kohlenstoffquellen wurden den Grundmedien in variierenden Mengen erst im Verlauf der Kultivierungen zugesetzt. Nähere Erläuterungen zu der Art, Menge und Zeitpunkt der Zugabe dieser Stoffe sind im Ergebnissteil aufgeführt.

2.4. Kulturführung

2.4.1. Stammhaltung auf Agarplatten

Zur Stammhaltung wurde *Candida bombicola* mit Hilfe einer Impföse unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten ausgestrichen und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Nach dem Anwachsen der Reinkultur wurden die Agarplatten luftdicht verschlossen bei 4 °C für vier Wochen gelagert und danach erneuert.

2.4.2. Vorkultur

Von den Agarplatten wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse Kulturmateriel auf mit 100 ml Vorkulturmedium befüllte 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen übertragen. Die Inkubation dieser Vorkulturen erfolgte für 48 h (bzw. 72 h im Falle der Vorkultur für den Bioreaktor) bei 30°C und 100/min.

2.4.3. Kultivierung in Schüttelkolben

Zur Produktion der Sophoroselipide in Schüttelkolben dienten 500 ml bzw. 2000 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen, die mit 100 ml bzw. 500 ml Hauptkulturmedium befüllt waren. Als Inokulum dienten jeweils 2% (v/v) der Vorkultur. Diese Hauptkultivierungen wurden bei 30°C und 100/min inkubiert. Die Gesamtinkubationszeit betrug zwischen 8 und 9 Tagen. Die Zudosierung der hydrophoben Kohlenstoffsubstrate erfolgte portionsweise jeweils 24, 48 und 72 h nach dem Start der Inkubation (genauer im Ergebnisteil).

2.4.4. Kultivierung im Bioreaktor

Zur Produktion von Sophoroselipiden im größeren Maßstab dienten Kultivierungen in 10 l- und 30 l- Bioreaktoren der Firma Braun Biotech International GmbH, Melsungen. Diese waren mit der folgenden Mess- und Regeltechnik ausgestattet:

- Sterilisierbare, drucküberlagerte pH-Elektrode (Ingold AG, Zürich) mit on-line Registrierung
- Sterilisierbare Sauerstoffelektrode (Ingold AG, Zürich) mit Verstärker und on-line Registrierung
- Sterilfilter und regelbares Rotameter für die Zuluft
- Tachogenerator für die Rührerdrehzahlkontrolle
- Temperaturregelkreis mit Thermofühler PT-100 und Thermostat mit Kühlwasserkreislauf

- Drehzahlregler mit automatischer Registrierung
- Sterilisierbares Handprobenahmeventil

An die Abluftstrecke, die über einen Kühler und eine Dampffalle verfügte, war eine Abgasanalyse der Firma Maihak, Hamburg angeschlossen. Damit war die on-line-Erfassung des prozentualen O₂-Gehaltes in der Abluft aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften des Gases mittels des Messgerätes Oxigor 6 N (Maihak, Hamburg) möglich. Gleichzeitig wurde die Konzentration des Kohlendioxids in der Abluft anhand der Absorption des Gases im infraroten Bereich des Lichts mittels des Messgerätes Unor 6 N erfaßt.

Die Reaktoren wurden mit ca. 80 % Hauptkulturmedium (Details im Ergebnisteil) befüllt und nach der 20minütigen Sterilisation bei 121°C und 1 bar Überdruck mit 2% (v/v) der - unter aseptischen Bedingungen in eine sterile Animpfflasche überführten - Kultursuspension der Vorkultur beimpft. Die Kultivierung der Hefe erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

- Temperatur: 30°C
- Begasungsrate: 0,5 l/(l·min)
- Rührsystem: drei sechsblättrige Rushton-Turbinen
- Startdrehzahl: 250 - 350/min
- pH: ungeregelt bis pH 3,5, dann Regulierung durch Zugabe von NaOH
- automatische Zugabe der hydrophoben Kohlenstoffquelle mit einer MV-GE Schlauchpumpe der Firma Ismatec GmbH, Wertheim-Mondfeld

Alternativ wurde die Abgasanalyse bezüglich der Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration von einem Abgasanalysegerät (CO₂- bzw. O₂- Sensoren) der Firma BlueSens, Herten, detektiert. Die Daten der Abgasanalyse wurden an den Leitrechner übermittelt und durch die Software MFCS/win erfasst. Somit konnte die Entwicklung wichtiger Prozessparameter über den gesamten Kultivierungsverlauf online überwacht werden.

2.5. Bestimmung der Kultivierungsparameter

Bei den 500 ml und 2000 ml Schüttelkolben wurde am Ende der Kultivierungen die Biotrockenmasse, Glucosekonzentration, Sophoroselipidkonzentration, Restcosubstrat sowie der pH-Wert bestimmt. Zum Zeitpunkt der Cosubstratzugabe wurden keine Proben entnommen. Bei den Bioreaktorkultivierungen diente regelmäßige Probennahme zur Ermittlung der Biotrockenmasse, Zellzahl, Restcosubstrat-, Glucose- und Sophoroselipidkonzentration neben der on-line- Erfassung der Kultivierungsparameter pH-Wert, Sauerstoffsverbrauchsrate, Kohlendioxidbildungsrate und Respirationskoeffizient.

2.5.1. Biotrockenmasse

Die Biotrockenmasse wurde in Doppelansätzen gravimetrisch bestimmt. Dazu wurden 10 ml Kultursuspension in vorher ausgewogene Metallbecher überführt und 30 min bei 13000/min in einer Sigma-Zentrifuge 3MK zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Analytik aufbewahrt und das Zellpellet mit 10 ml Ethanol/1-Butanol 1/1 (v/v) gewaschen um eventuelle Reste der hydrophoben Kohlenstoffquellen oder ausgefallenes Sophoroselipid zu entfernen. Nach einer erneuten Zentrifugation und dem anschließenden Dekantieren des Überstandes wurden die Metallbecher 48 h bei 80 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und abschließend gewogen.

2.5.2. pH-Wert

Die potentiometrische Messung des pH-Wertes in 5 ml Proben der Schüttelkulturen erfolgte mit der Elektrode Mettler Toledo InLab® 412, die an ein pH-Meter CG 802 der Firma Schott Geräte angeschlossen war.

2.5.3. Glucosekonzentration

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte in den unter 2.5.1. erwähnten Überständen.

Die Konzentrationen wurden mit dem Accutrend® alpha Messgerät der Firma Boehringer Mannheim ermittelt. Hierbei werden 20 µl Probelösung auf einen Einwegmessstreifen pipettiert, die Glucose wird durch auf dem Messstreifen immobilisierte Glucose-Oxidase umgesetzt und diese Reaktion durch das Messgerät (Messbereich: 0,2 - 5,0 g/l) reflektionsphotometrisch erfaßt.

Alternativ diente der UV-Test der Firma Boehringer Mannheim (Best. Nr. 0716251) zur Bestimmung der Glucosekonzentration. Bei diesem Test wird die in den Probelösungen enthaltene Glucose (Messbereich: 0,08 – 0,5 g/l) durch das Enzym Hexokinase und ATP zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert, welches in Gegenwart von NADP durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase oxidiert wird. Die bei dieser Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der Glucose-Menge äquivalent und kann aufgrund der Absorption bei 340 nm bestimmt werden. Der Test wurde wie in der ihm beiliegenden Anleitung beschrieben durchgeführt, die Extinktionen wurden mit dem Spektralphotometer Ultrospec 3000 der Firma Pharmacia Biotech, Cambridge/England gemessen.

2.5.4. Saccharosekonzentration

Die Bestimmung der Saccharosekonzentration erfolgte in den unter 2.5.1 erwähnten Überständen. Bei dem verwendeten Saccharose/Glucose-Test (Best.Nr. 0139041, Boehringer Mannheim) wird der Gehalt an D-Glucose vor und nach der enzymatischen Hydrolyse der Saccharose durch β -Fructosidase bestimmt. Das Enzym Hexokinase katalysiert bei einem pH-Wert von 7,6 die Phosphorylierung von D-Glucose mit ATP unter gleichzeitiger Bildung von ADP. Das entstehende D-Glucose-6-Phosphat wird durch das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Gegenwart von NADP zu D-Gluconat-6-Phosphat oxidiert, wobei NADPH entsteht. Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent und wird anhand ihrer Absorption bei

340 nm bestimmt. Der Test wurde wie in der ihm beiliegenden Anleitung beschrieben durchgeführt, die Extinktionen wurden mit dem Spektralphotometer U-1100 der Firma Hitachi, Tokio, Japan gemessen.

2.5.5. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Anzahl an lebenden Zellen wurde anhand der CFU (Colony Forming Units) – Methode vorgenommen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit sterilem Vorkulturmedium hergestellt, in dem 100 µl Probe zu 900 µl Medium gegeben wurden. Diese Suspension wurde gemischt und wiederum 100 µl in 900 µl Medium überführt. Dies wurde zehnmal wiederholt, so dass die Zellzahl der letzten Verdünnung 10^{-10} mal so groß war wie die der Ausgangssuspension. Je 3 mal 100 µl der einzelnen Verdünnungen wurden auf Agarplatten aufgetragen, für 48 h bei 30°C inkubiert und danach die Einzelkolonien gezählt. Die Zellzahl wurde als Mittelwert der einzelnen Verdünnungen bestimmt. Dabei wurden die Verdünnungen berücksichtigt, bei denen die CFU-Zahl < 100 pro Platte betrugen.

2.5.6. Überprüfung der Zellvitalität

Zur Überprüfung der Vitalität der *Candida bombicola* Zellen wurden die Zellen mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) angefärbt und unter UV-Licht der Wellenlänge 488 nm mikroskopiert. Dazu wurde Zellsuspension mit FDA-Lösung im Verhältnis 1/500 (v/v) und mit PI-Lösung im Verhältnis 1/5 (v/v) gemischt und 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Verwendete Lösungen:

FDA-Stammlösung: 5 mg/ml in Aceton, bei 4°C dunkel gelagert

FDA-Arbeitslösung: Stammlösung 1:500 in PBS verdünnt

PI-Stammlösung: 5 mg/ml Propidiumiodid in H₂O, bei 4°C dunkel gelagert

PI-Arbeitslösung: Stammlösung 1:5 in PBS

1x PBS-Puffer

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
destilliertes Wasser	ad 1 l

Der pH-Wert wird vor dem Autoklavieren auf 7,4 eingestellt.

2.5.7. Sauerstoffverbrauchsrate, Kohlendioxidbildungsrate und respiratorischer Koeffizient

Die Volumenprozent an Kohlendioxid und Sauerstoff im Bioreaktorabgas wurden kontinuierlich durch ein Abgasanalysegerät der Firma Maihak (Hamburg) gemessen. Vor jeder Kultivierung wurden die Messgeräte mit einem Gasgemisch definierter Zusammensetzung (Firma Linde, Hannover) kalibriert. Mit der Annahme, dass sich die Zuluft nur aus den Gasen Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff in konstanter Konzentration zusammensetzt, kann durch die Messung des Abluftstromes und mit den gegebenen Prozessgrößen die Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} und die Kohlendioxidbildungsrate Q_{CO_2} berechnet werden. Für die Berechnung wird eine quasistationäre Inertgasbilanz über die ein- und austretenden Gasvolumenströme vorausgesetzt (Einselle et al., 1985). Es wird dabei ein differentiell kleiner Zeitbereich betrachtet, in dem die Biomasseänderung vernachlässigbar ist. Die nachfolgend dargestellten Bilanzgleichungen gelten jedoch nur für folgende Annahmen:

- Das Gasgemisch verhält sich ideal
- Die Zuluft besteht nur aus N₂, O₂, CO₂
- Die Gasströme sind auf den Normalzustand bezogen ($p_N = 1\text{ bar}$, $T_N = 273,15\text{ K}$) und trocken
- Stickstoff passiert den Reaktor als inerter Bestandteil

- CO₂ ist das einzige gasförmige Stoffwechselprodukt
- Der Zuluftstrom ist konstant und bekannt

$$Q_{O_2} = \frac{\dot{V}^N \cdot P^N \cdot X_{O_2}^E \cdot MG_{O_2}}{V_F \cdot R \cdot T^N} \cdot \left[1 - \frac{X_{O_2}^A \cdot (1 - X_{O_2}^E - X_{CO_2}^E)}{X_{O_2}^E \cdot (1 - X_{O_2}^A - X_{CO_2}^A)} \right] \quad (3)$$

$$Q_{CO_2} = \frac{\dot{V}^N \cdot P^N \cdot X_{CO_2}^E \cdot MG_{CO_2}}{V_F \cdot R \cdot T^N} \cdot \left[\frac{X_{CO_2}^A \cdot (1 - X_{O_2}^E - X_{CO_2}^E)}{X_{CO_2}^E \cdot (1 - X_{O_2}^A - X_{CO_2}^A)} - 1 \right] \quad (4)$$

mit:

V_N	Volumenstrom der Zuluft unter Normbedingungen
MG	Molekulargewicht
R	allgemeine Gaskonstante
x_i^A, x_i^E	Molenbruch der Komponente i im Gasaustritt bzw. im Gaseintritt
p_N	Gasdruck unter Normbedingungen
V_R	Reaktorvolumen
T_N	Temperatur unter Normbedingungen

Mit diesen beiden gemessenen Raten, der CO₂-Bildung und dem O₂-Verbrauch, lässt sich der respiratorische Quotient RQ nach Gleichung 3 berechnen. Er dient vor allem zur Beurteilung der Art der Substratverwertung.

$$RQ = \frac{q_{CO_2}}{q_{O_2}} = \frac{(Q_{CO_2} / MG_{CO_2})}{(Q_{O_2} / MG_{O_2})} \quad (5)$$

Ein an die Abgasanalytik angeschlossener PC speichert in regelmäßigen Abständen die Daten vom Abgasstrom (Vol% CO₂, Vol O₂, QO₂, QCO₂, RQ und die dazugehörige Kultivierungszeit). Der auf dem Abgasrechner unter dem Betriebssystem MS DOS 6.0 (Fa. Microsoft Corporation, München) installierte Abgasmanager wurde 1992 von Gura (Gura, 1992) entwickelt und ausführlich beschrieben.

2.5.8. Ausbeutekoeffizienten

Der Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ stellt das Verhältnis von Zellmassenbildung zu Substratverbrauch pro Zeiteinheit dar. Der Ertragskoeffizient setzt sich aus dem Verbrauch an Substrat für Zellwachstum und Erhaltungsstoffwechsel zusammen.

$$Y_{X/S} = \frac{\text{Biomassebildung}}{\text{Substratverbrauch}} = \frac{c_X(t_1) - c_X(t_0)}{c_S(t_1) - c_S(t_0)} \quad (6)$$

Der Produktausbeutekoeffizient $Y_{P/S}$ ist der Quotient aus Produktbildung und Substratverbrauch.

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Produktbildung}}{\text{Substratverbrauch}} = \frac{c_P(t_1) - c_P(t_0)}{c_S(t_1) - c_S(t_0)} \quad (7)$$

Beide Ertragskoeffizienten werden in der Praxis häufig zur Ermittlung der Effizienz verwendet. Im Mittelpunkt steht dabei die Umwandlung der Edukte in Biomasse und vor allem in die gewünschten Produkte.

Bei der Prozessoptimierung ist weiterhin die Produktbildung pro Biomasse $Y_{P/X}$ sowie die Produktbildungsrate P_V von Bedeutung.

$$Y_{P/X} = \frac{\text{Produktbildung}}{\text{Biomassebildung}} = \frac{c_P(t_1) - c_P(t_0)}{c_X(t_1) - c_X(t_0)} \quad (8)$$

$$P_V(t) = \frac{c_P(t_1) - c_P(t_0)}{t_1 - t_0} \quad (9)$$

Die Produktbildungsrate gibt die differentielle Änderung der gebildeten Masse an dem gewünschten Produkt pro Zeiteinheit [kg/h] an. Wird die Produktbildungsrate auf das bei der Kultivierung zur Verfügung stehende Volumen bezogen, so erhält man die volumetrische Produktivität oder auch Raum-Zeit-Ausbeute [kg/m³·h].

2.5.9. Gewinnung des Produktes aus der Kultursuspension sowie gravimetrische Sophoroselipidbestimmung

Zur Gewinnung der Sophoroselipide wurde folgendermaßen verfahren:

1. Die gesamte Kultursuspension wurde nach Beendigung der Kultivierung zweimal mit dem gleichen Volumen an tert-Butylmethylester (bezogen auf das Volumen der Kultursuspension) extrahiert.
2. Die organischen Phasen wurden im Scheidetrichter abgetrennt und vereinigt und anschließend am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abgezogen.

Dadurch wurde zunächst ein Rohextrakt gewonnen. Um nicht umgesetzte Restmengen der hydrophoben Substrate aus den Rohextrakten zu entfernen, erfolgte eine zweite Extraktion mit einem Methanol/Wasser/Hexan-Gemisch 3:1:1 (v/v/v). Dazu wurde wie folgt verfahren:

1. Es wurden die Rohextrakte in Methanol/Wasser 3:1 (v/v) (pH 3,5) gelöst und diese wässrige Phase zweimal mit einem Volumen Hexan (bezogen auf das Volumen an Wasser in der Methanol/Wasser-Phase) extrahiert. Die Sophoroselipide sind in Hexan nur wenig löslich, gleiches gilt für die hydrophoben Substrate bezüglich der Methanol/Wasser-Phase.
2. Die vereinigten Hexanphasen wurden eingeeengt, die Restmenge der hydrophoben Substrate gravimetrisch bestimmt und auf das Kulturvolumen bezogen protokolliert.
3. Das Methanol der Unterphase wurde unter vermindertem Druck aus der wässrigen Phase abgezogen und diese wurde anschließend gefriergetrocknet. Daraus wurde die Sophoroselipidausbeute bestimmt.

2.6. Chromatographische Methoden

2.6.1. Dünnschichtchromatographie

2.6.1.1. Stationäre und mobile Phase

Zur qualitativen Analytik der Sophoroselipidgemische mittels Dünnschichtchromatographie wurden Proben auf mit Kieselgel 60 F₂₅₄ bzw. mit RP-18 F_{254s} beschichtete Alufolien der Firma Merck/Darmstadt getüpfelt und anschließend in folgenden Laufmitteln entwickelt:

Kieselgel 60 F ₂₅₄	Chloroform/Methanol/Wasser	65/15/2 (v/v/v)
	Dichlormethan/Aceton	96/4 (v/v)
RP-18 F _{254s}	Methanol/Wasser	90/10 (v/v)

Die mobile Phase Dichlormethan/Aceton in Kombination mit Kieselgel 60 F₂₅₄ wurde in Verbindung mit der Sprühreagenz Dichlorfluorescein zur Überprüfung der Abtrennung nicht umgesetzter hydrophober Kohlenstoffquellen verwendet.

2.6.1.2. Sprühreagenzien

Zur optischen Detektion wurden die Chromatogramme mit folgenden Sprühreagenzien besprüht und 30 s bei 160°C erhitzt :

α-Naphthol-Schwefelsäure:

α-Naphthol ,15 % in Ethanol	10,5 ml
konzentrierte H ₂ SO ₄	6,5 ml
Ethanol	40,5 ml
H ₂ O	4,0 ml

α-Naphthol-Schwefelsäure bewirkt eine Violettfärbung von Zuckern und zuckerhaltigen Verbindungen (Stahl, 1967).

2.6.2. Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatographie (MPLC)

Zur gezielten präparativen Isolierung einzelner Komponenten des nativen Sophoroselipidgemisches kam die Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatographie zum Einsatz. Diese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

-Probenmenge:	0.1 – 3 g
-Säulen:	Merck® Lobar® Glasfertigsäulen Büchi-Chromatographiesäulen
-Stationäre Phase:	Merck® Kieselgel 60; Merck® LiChrospher® 100 RP-18
-Mobile Phase:	Chloroform/Methanol/Wasser (65/15/2) Chloroform/Methanol (4/1)
-Pumpe:	Büchi
-Volumenstrom:	0.5 -3.0 ml/min
-Detektor:	UV-Licht (280 nm)

2.6.3. Strukturaufklärung durch Kernspinresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie

Es wurden an einem 300°K Bruker ARX 400 und AVANCE DMX 600 Spektrometer ¹H-NMR-Standardspektren und ¹H-breitbandentkoppelte ¹³C-NMR-Spektren aufgenommen. Zur genaueren Zuordnung der ¹H-NMR- und der ¹³C-NMR-Signale wurden für alle Substanzen zweidimensionale (H,H)- und (C,H)-korrelierte Spektren (COSY, HMBC) aufgenommen. In allen Fällen wurden Chloroform/Methanol-Gemische (jeweils deuteriert) als Lösungsmittel benutzt.

Anschließend wurden positive Elektrospray Massenspektren (ESI-MS) auf einem Finnigan-MAT TSQ 700 vierfach Quadrupol Massenspektrometer aufgenommen.

Die Untersuchungen wurden am HZI (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) von Herrn Dr. V. Wray und Herrn Dr. M. Nimtz durchgeführt.

2.6.4. Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die Untersuchungen wurden am Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig bei der AG von Herrn Prof. Dr. Schulz durchgeführt.

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Lipidkomponenten der Sophoroselipidgemische wurden diese einer Methanolyse unterzogen und anschließend wurde eine gekoppelte Gaschromatographie/ Massenspektrometrie durchgeführt.

Dazu wurden 20 ml Methanol unter Stickstoff auf 0°C gekühlt und nach Zutropfen von 1,42 ml Acetylchlorid 10 min bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von 50 mg Glycolipid wurde die Reaktionslösung 3 h unter Rückfluss erhitzt, nach beendeter Reaktion 20 ml Eis/Wasser zugegeben und die Lösung dreimal mit je 1 ml Cyclohexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet.

Zur Silylierung der Hydroxygruppe wurden 100 µl der organischen Phase mit 50 µl MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoracetamid) versetzt, und nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 50°C wurde die Reaktionslösung mit Stickstoff abgeblasen und anschließend mit wenig Dichlormethan aufgenommen. Die auf diese Weise vorbereiteten Proben wurden gaschromatographisch aufgetrennt und die einzelnen Komponenten durch gekoppelte Massenspektrometrie identifiziert.

Analysebedingungen:

Säule:	BPX-5, 25 m
Trärgas:	Helium
Injektion:	30 s, splitless
Ofentemperatur:	1 min 60°C, 60°C → 320°C (5°C/min)
Detektor:	Mass Selective Detector, Hewlett Packard, USA

2.7. Aufarbeitungstechniken

Für die Ultraschall- und Membran-Separationsexperimente wurden verschiedene Lösungen unter verschiedenen Bedingungen verwendet: Für die Versuche zur grundsätzlichen Durchführbarkeit sowie zur Charakterisierung der Ultraschalltrennung wurden als Modelllösung wässrige Suspensionen von *C. bombicola*-Zellen verwendet, die in dem in Kapitel 2.3.1. beschriebenen Medium mit Glucose für 48 h gewachsen waren, ohne Zugabe hydrophober Co-Substrate. Die Suspension wurde ohne zusätzliche Aufarbeitungsschritte direkt für die UES-Versuche verwendet.

Außerdem wurden reale Medien verwendet, d.h. Suspensionen von *C. bombicola*-Zellen aus wässrigem Medium mit hinzugefügtem hydrophoben Co-Substrat, entweder aus Schüttelkolben- oder Bioreaktorkultivierungen. Auch diese Suspensionen wurden ohne zusätzliche Aufarbeitung direkt für die Experimente verwendet.

2.7.1. Ultraschallseparation

In der vorliegenden Arbeit wurden Separationsexperimente mit Hilfe einer vom Institut für angewandte Physik der Technischen Universität Wien zur Verfügung gestellten Ultraschalltrennapparatur durchgeführt. Zunächst wurde eine äquivalente Apparatur zur BioSep-Chamber 10 l/d der Firma Applikon, Schiedam Niederlande, verwendet. Die Steuerung erfolgte mit einem APS 990 BioSep Controller. Dieser wurde mit 230 V Wechselspannung betrieben und erzeugte stehende Ultraschallfelder mit Frequenzen von ca. 2,1 MHz. Die Anlage wurde mit Leistungen zwischen 15 und 50 W betrieben. Eine alternative Apparatur bestand aus einer frequenzmodulierenden Wechselstromquelle hoher Frequenz (Typ USCS-05 der Firma Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) und der eigentlichen Trenneinheit (Typ USSD-05 der Firma Anton Paar GmbH, Graz, Österreich). Auch hier wurde die Stromquelle mit 230 V Netzspannung betrieben, sie erzeugte stehende Ultraschallfelder mit Frequenzen von ca. 2,1 - 2,2 MHz bei Leistungseinträgen von 30 bis 50 W.

2.7.2. Crossflow-Filtration

Experimente zur Querstromfiltration wurden mit Filtrationsmembranen aus Polysulfon-Keramik durchgeführt. Diese waren 50 cm lang und hatten Porengrößen von 100 nm (für die Mikrofiltration zwecks Zellrückhaltung) bzw. waren für Partikel mit einer relativen molekularen Größe von weniger als 5 kD durchlässig (für die Ultrafiltration zwecks Sophoroselipidrückhaltung). Die dafür verwendete Pumpe war eine NLU20B-Pumpe der Firma Netzsch Monopumpen GmbH, Waldkraiburg.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in drei Teile: zunächst erfolgt die Darstellung von Schüttelkolbenexperimenten mit *Candida bombicola*, in denen verschiedene hydrophobe Substrate auf ihre Eignung als C-Substrat zur Produktion von Sophoroselipiden untersucht worden sind. Anschließend werden Versuche zur Charakterisierung von Ultraschallseparation und Querstromfiltration zur Zellabtrennung von *C. bombicola* beschrieben. Schließlich werden Bioreaktorexperimente dargestellt, in denen die Produktion von Sophoroselipiden optimiert werden soll, u. a. durch Integration der Ultraschallseparation zur Aufreinigung von Sophoroselipiden aus Kultivierungssuspensionen in den Produktionsprozess.

3.1. Tests verschiedener Co-Substrate für die Sophoroselipid-Bildung

Da bekannt ist, dass die Hefe *C. bombicola* ATCC 22214 auf vielen verschiedenen Kohlenstoffquellen wachsen kann und vor allem bei Anwesenheit hydrophober Substrate Sophoroselipide bildet (u. a. Inoue & Ito 1982, Ito & Inoue 1982, Cooper & Paddock 1984, Klekner et al. 1991, Casas & García-Ochoa 1999, Solaiman et al. 2007), wurden Experimente durchgeführt, bei denen unterschiedliche hydrophile und hydrophobe Kohlenstoffquellen verwendet wurden. Sie wurden in Hinsicht darauf untersucht, ob *C. bombicola* ATCC 22214 damit gutes Wachstum und signifikante Sophoroselipidbildung zeigt, aber auch, ob damit neuartige Zusammensetzungen der Glycolipide erzielt werden können.

C. bombicola ATCC 22214 wächst sehr gut mit einfachen Zuckern als alleiniger Kohlenstoffquelle, bildet dann allerdings nur geringe Mengen an Sophoroselipiden (Albrecht et al. 1996). Deshalb sollten zunächst sowohl Wachstum als auch Produktbildung bei ausschließlicher Anwesenheit von Zuckern als C-Quellen untersucht werden. Anschließend wurden unterschiedliche hydrophobe Co-Substrate mit Zucker zusammen als C-Quelle eingesetzt. Da bekannt ist, dass das Produktspektrum von *C. bombicola* stark abhängig ist von den verwendeten Co-Substraten (u. a. Asmer et al. 1988, Brakemeier et al. 1995), war hier von

besonderem Interesse, ob sich dadurch neuartige Sophoroselipide herstellen ließen. Als hydrophobe Co-Substrate wurden Alkane, Fettalkohole, Ölsäuren und Pflanzenöle verwendet.

3.1.1. Zucker als alleinige C-Substrate

Vor allem um eine Vergleichsmöglichkeit zu Wachstum und Produktbildung unter Verwendung von Co-Substraten zu bekommen, wurden zunächst Schüttelkolbenexperimente mit Glucose und Saccharose als alleinigen C-Quellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind Abb. 11 zu entnehmen.

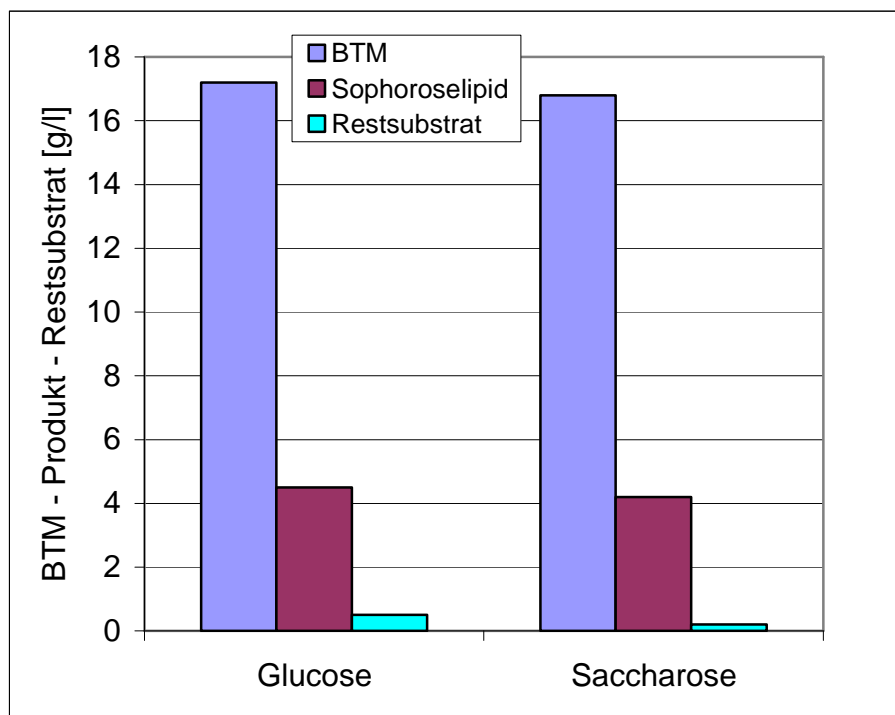


Abb. 11: Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstrat bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als alleinigen C-Quellen im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose

Sowohl Biomasse- als auch Produktertrag waren bei beiden Kultivierungen annähernd identisch. Allerdings war der Ertrag an Sophoroselipiden wie erwartet eher klein mit ca. 4 g/l und einem Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ von ca. 0,04 für beide Kultivierungen. Die pH-Werte lagen in beiden Kultivierungen im Bereich zwischen 3 - 4: Der pH-Wert lag unter Verwendung von Glucose bei 3,2, mit Saccharose bei 3,9. Abb. 12 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der Produkte der Kultivierungen mit Glucose und Saccharose bei Verwendung von Normalphasen- und reversed phase-

Kieselgel-Chromatographie. Es ist in beiden Auftrennungen gut zu erkennen, dass das Produktmuster beider Kultivierungen sich nicht wesentlich unterscheidet. Da somit Saccharose für die Produktion von Sophoroselipiden sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht gleich gut wie Glucose geeignet ist, wurde sie weiterhin auf ihre mögliche Verwendung als Ersatz für Glucose in den folgenden Schüttelkultivierungen mit hydrophoben Co-Substraten untersucht.

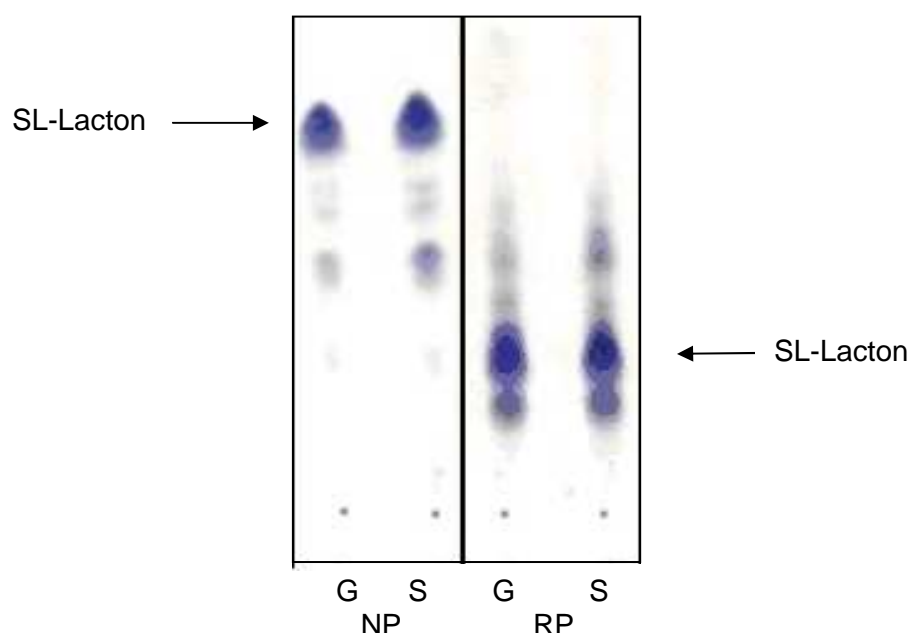


Abb. 12: Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als C-Quellen produzierten SL. Bedingungen: Normalphase (NP): stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Reversed Phase (RP): stationäre Phase: RP-18-Kieselgel F_{254s}, mobile Phase: Methanol/Wasser 90/10 (v/v). Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure.

Um beurteilen zu können, ob sich durch die Verwendung ungewöhnlicher Co-Substrate neuartige Produkte ergeben, wurden einige der in Schüttelkolbenexperimenten produzierten SL durch GC-MS auf ihr Fettsäuremuster hin untersucht. In Tab. 2 sind die dabei erzielten Ergebnisse für die Kultivierung mit Glucose aufgeführt. Man kann gut erkennen, dass zwei Komponenten, nämlich Fettsäuren der Kettenlänge C18 mit einer (ω -1)-OH-Gruppe mit 76,5 %, dabei deutlich überwiegen. Diese unterscheiden sich nur durch das Vorhandensein einer Doppelbindung. Bereits sehr viel seltener, aber immer noch mit über 5 % Anteil vorhanden, sind die Fettsäuren 16-OH-Hexadecansäure, 18-OH-Oktadecensäure und 15-OH-Hexadecansäure. Die übrigen hydrophoben Komponenten haben nur

noch einen Anteil von ca. 1 % oder weniger und sind deshalb von geringerer Bedeutung.

Tab. 2: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten in SL aus der Kultivierung von *C. bombicola* ATCC 22214 mit Glucose als alleiniger C-Quelle.

Lipidkomponente	Anteil [%]
FS 17-OH-C 18:1	46,9
FS 17-OH-C 18:0	29,6
FS 16-OH-C 16:0	6,6
FS 18-OH-C 18:1	5,6
FS 15-OH-C 16:0	5,1
FS 16-OH-C 16:1	1,3
FS 18-OH-C 18:0	1,3
FS 18-OH-C 18:2	0,6
FS 16-OH-C 17:0	0,6
FS 18-OH-C 19:0	0,4
FS 16,17-DiOH-C 18:0	0,4
FS C 18:0/ME	0,3
FS 16-OH-C 18:1	0,3
FS 16-OH-C 18:0	0,3
FS 15,16-DiOH-C 17:0 ?	0,3
FS 15-OH-C 16:1	0,2
nicht identifiziert	0,3

3.1.2. Alkane als Co-Substrate

Die Verwendung von Alkanen als Co-Substrate zur SL-Produktion ist vielfach in der Literatur beschrieben. Um jedoch Vergleichsmöglichkeiten zur Eignung von neuartigen Co-Substraten und zur Verwendung von Saccharose anstatt Glucose zu bekommen, wurden Experimente mit n-Hexadecan als Co-Substrat durchgeführt. Als weiteres Co-Substrat wurde das technische Gemisch Mihagol-S verwendet, das hauptsächlich aus unverzweigten Alkanen der Kettenlängen C₁₄/C₁₅ besteht. Die Ergebnisse der Kultivierungen sind Abb. 13 zu entnehmen.

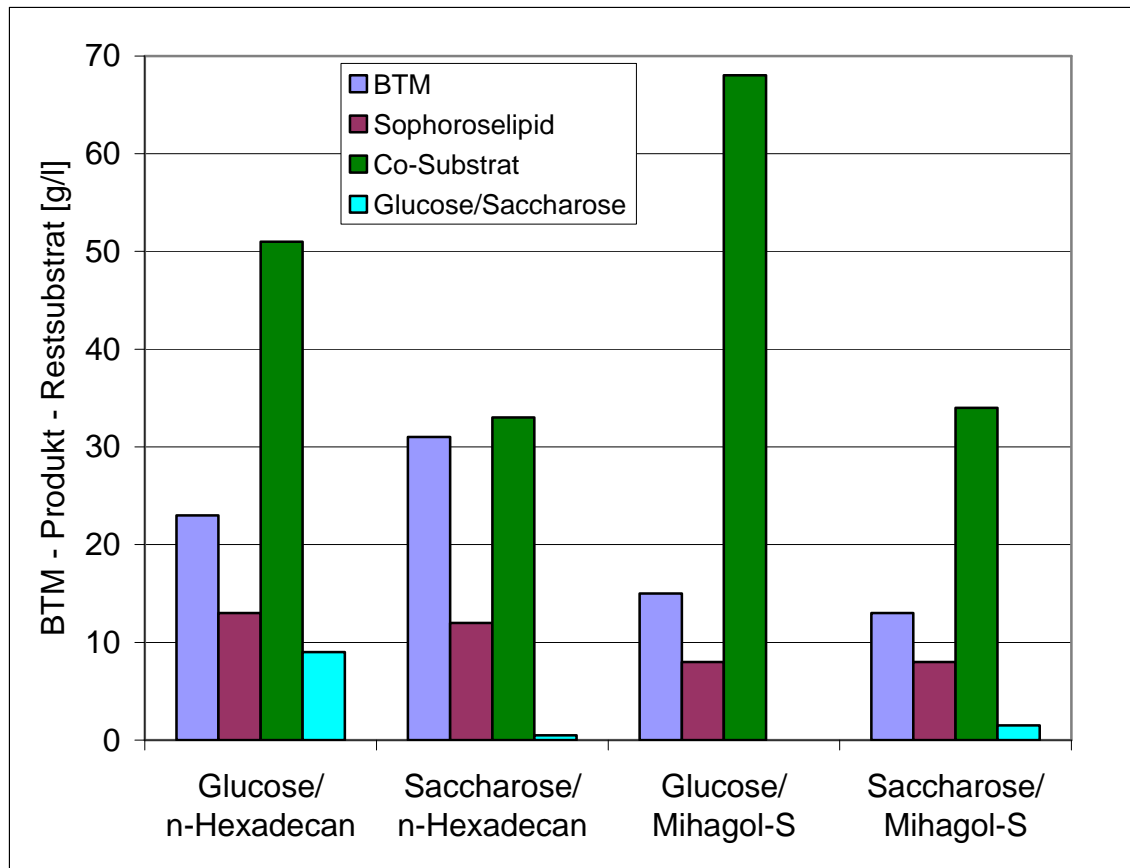


Abb. 13: Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie n-Hexadecan und Mihagol-S als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h (und nach 96 h bei der Kultivierung auf Glucose/Mihagol-S).

Die erreichte Konzentration an Sophoroselipiden zum Ende der Kultivierung war mit ca. 13 g/l für das Co-Substrat n-Hexadecan zwar größer als für Mihagol-S. Die hydrophilen Kohlenstoffquellen schienen hier keinen Einfluss auf die Endkonzentration zu haben; die Ertragskoeffizienten der einzelnen Kultivierungen betrugen $Y_{P/S}$ 0,086 für Glucose mit n-Hexadecan, 0,079 für Saccharose mit n-Hexadecan, 0,047 für Glucose mit Mihagol-S sowie 0,053 für Saccharose mit Mihagol-S.

Abb. 14 zeigt das Normalphasen-Dünnschichtchromatogramm der unterschiedlichen Produkte. Es ist erkennbar, dass nach Kultivierung mit Mihagol-S als Co-Substrat einige Banden mehr zu sehen sind als mit Hexadecan.

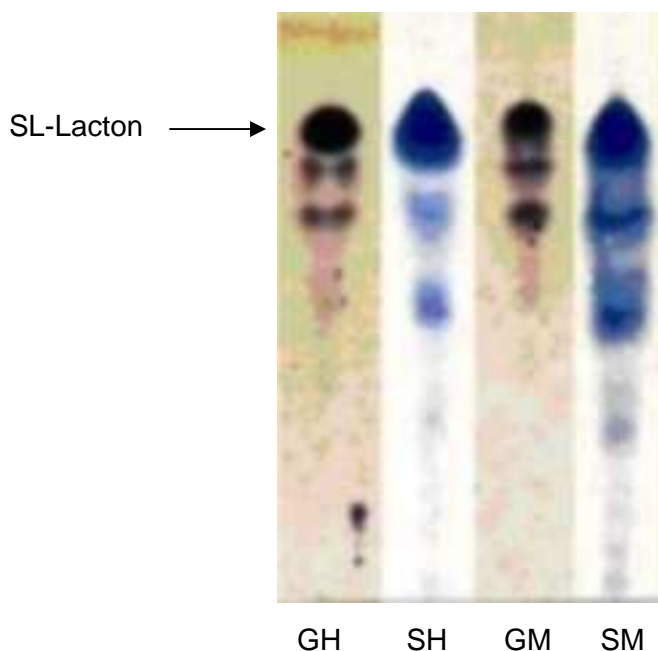


Abb. 14: Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als hydrophilen C-Quellen sowie n-Hexadecan (H) und Mihagol-S (M) als hydrophoben Co-Substraten produzierten SL. Bedingungen: stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure.

Deshalb wurden auch die mit den Substraten Glucose sowie n-Hexadecan und Mihagol-S erhaltenen SL einer GC-MS-Analyse ihrer Fettsäuremuster unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt. Wie erwartet weist das SL-Produkt, das mit Mihagol-S hergestellt wurde, eine deutlich höhere Diversität bezüglich seiner Lipidkomponenten auf als das Produkt aus n-Hexadecan. Allerdings kann man auch gut erkennen, dass sich der größte Teil der Lipidkomponenten (> 95 % für Glucose / n-Hexadecan, > 61 % für Mihagol-S / n-Hexadecan) aus denjenigen zusammensetzt, die auch den größten Teil bei der Kultivierung mit Glucose ausmachen, nämlich den gesättigten oder einfach ungesättigten Lipidkomponenten der Kettenlängen C₁₆ oder C₁₈ mit einer Hydroxy-Gruppe in (ω -1)- oder ω -Position. Bei der Kultivierung mit Mihagol-S entsteht zusätzlich ein relativ großer Anteil (15,5 %) an Lipidkomponenten ungerader Kettenlänge, der sonst nur sehr selten vorkommt (1,3 % mit Glucose, nicht nachgewiesen mit Glucose / Hexadecan).

Tab. 3: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten in SL aus der Kultivierung von *C. bombicola* ATCC 22214 mit Glucose als hydrophiler C-Quelle und n-Hexadecan sowie Mihagol-S als Co-Substrat.

Glucose/ n-Hexadecan		Glucose/ Mihagol-S	
Lipidkomponente	Anteil [%]	Lipidkomponente	Anteil [%]
FS 16-OH-C 16:0	41,2	FS 17-OH-C 18:1	17,7
FS 15-OH-C 16:0	36,0	FS 15-OH-C 16:0	14,1
FS 17-OH-C 18:0	10,6	FS 16-OH-C 16:0	14,1
FS 17-OH-C 18:1	6,2	FS 17-OH-C 18:0	12,1
2-C 16-ol	2,7	2-C 14-ol	8,6
DFS C 16:0	1,3	FS 16-OH-C 17:0	7,2
FS 18-OH-C 18:1	0,5	FS 16-OH-C 17:0	3,6
FS 16-OH-C 16:1	0,3	FS 16-OH-C 16:1	2,3
FS 18-OH-C 18:0	0,3	FS 12-OH-C 18:1	2,0
nicht identifiziert	0,9	1-C 14-ol	1,7
		FS 13-OH-C 14:0	1,7
		FS 17-OH-C 17:0	1,5
		2-C 15-ol	1
		FS 18-OH-C 18:0	0,8
		FS 14-OH-C 15:0	0,6
		FS 15-OH-C 15:0	0,5
		FS 15,16-DiOH-C 17:0 ?	0,5
		FS 18-OH-C 19:0	0,5
		FS 15-OH-C 16:1	0,5
		FS 14-OH-C 14:0	0,4
		FS 16,17-DiOH-C 18:0	0,3
		Alkan	0,2
		Alkan	0,2
		Hexadecan	0,2
		Alkan	0,2
		1-C 15-ol	0,1
		1,14-C14-Diol	0,1
		nicht identifiziert	7,7

3.1.3. Fettalkohole als Co-Substrate

Da bekannt ist (Brakemeier et al. 1995, Brakemeier et al. 1998a, Brakemeier et al. 1998b) dass die Verwendung von sekundären Fettalkoholen der Kettenlängen C12 bis C16 als Co-Substraten geeignet ist, um Alkylsophoroside mit *C. bombicola* zu produzieren, sollten einige Fettalkohole in dieser Hinsicht untersucht werden. Da bei

Brakemeier unverzweigte Fettalkohole verwendet worden waren, wurden zwei davon, 2-Dodecanol und 2-Tetradecanol, zunächst als Co-Substrat zusammen mit Saccharose eingesetzt - abweichend von den publizierten Experimenten, in denen Glucose eingesetzt worden war. Die Ergebnisse der Kultivierungen mit 2-Dodecanol und 2-Tetradecanol sind in Abb. 15 dargestellt.

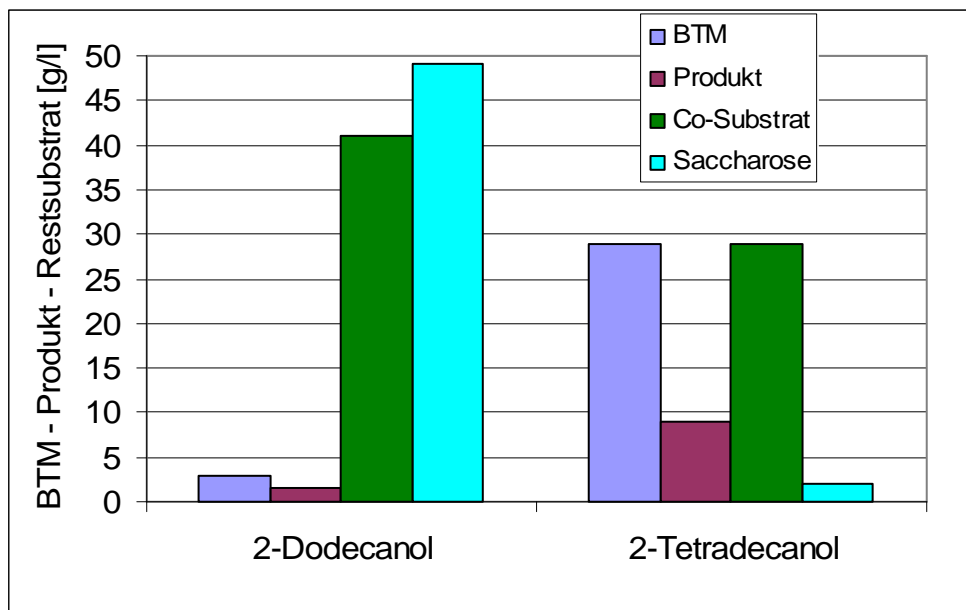


Abb. 15: Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Saccharose als hydrophiler C-Quelle sowie 2-Dodecanol und 2-Tetradecanol als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kultivierung mit 2-Dodecanol wenig befriedigende Ergebnisse erzielt. Es ist kaum Wachstum erkennbar und deshalb auch nur eine geringe Produktbildung von 1,5 g/l zu erzielen. Bei der Verwendung von 2-Tetradecanol hingegen sind sowohl gute Biomasse- als auch Produktbildung von 29 bzw. 9 g/l zu verzeichnen. Die entsprechenden Ertragskoeffizienten $Y_{P/S}$ sind in Tab. 4 verzeichnet.

Neben den geradkettigen wurden als weitere Co-Substrate verzweigte langkettige Alkohole verwendet. Diese waren Speziol 936U, eine technische Mischung mit der Hauptkomponente Isooleylalkohol, Rilanit G16, ebenfalls eine technische Mischung mit der Hauptkomponente 2-Hexyl-1-Decanol, sowie 2-Ethyl-1-Hexanol. Die Strukturformeln dieser Substrate zeigt Abb. 16.

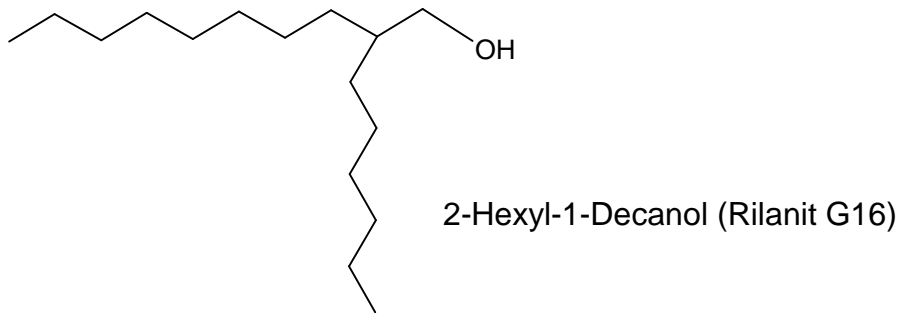
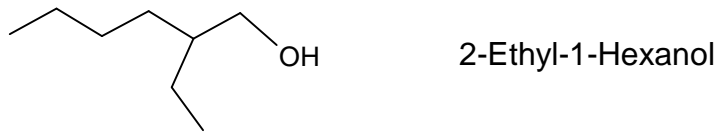
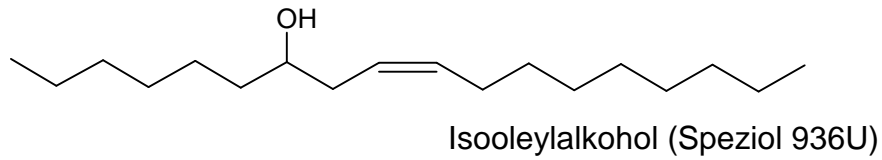


Abb. 16: Strukturformeln von Isooleylalkohol, der Hauptkomponente von Speziol 936U; 2-Ethyl-1-Hexanol und 2-Hexyl-1-Decanol, der Hauptkomponente von Rilanit G16.

Die Ergebnisse der Kultivierungen mit Speziol 936U, Rilanit G16 und 2-Ethyl-1-Hexanol sind in Abb. 17 dargestellt.

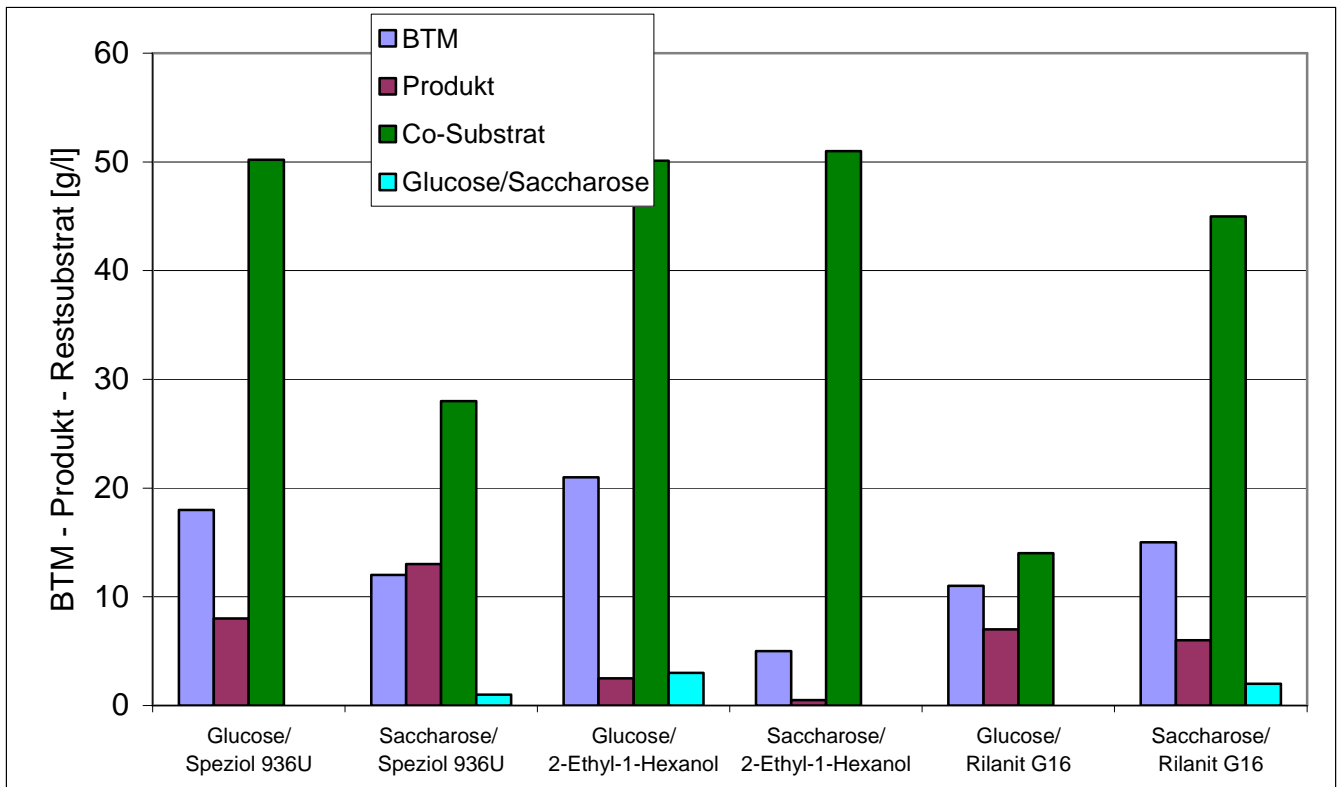


Abb. 17: Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Speziol 936U, 2-Ethyl-1-Hexanol und Rilanit G16 als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h.

Deutlich erkennbar ist, dass die Kultivierungen mit Speziol 936U mit 8 g/l bzw. 13 g/l die höchsten Produktkonzentrationen ergaben. Die Kultivierungen mit 2-Ethyl-1-Hexanol hingegen ergaben nur Produktkonzentrationen von 2,5 bzw. 0,5 g/l. Das hier eingesetzte Co-Substrat konnte nahezu vollständig zurückgewonnen werden, es fand also annähernd kein Umsatz statt. Die Kultivierungen mit Rilanit G16 ergaben mit 7 g/l bzw. 6 g/l zwar auch geringe, aber vorhandene Umsätze. Tab. 4 fasst noch einmal die Ertragskoeffizienten $Y_{P/S}$ der Kultivierungen zusammen.

Tab. 4: Überblick über die erzielten Ertragskoeffizienten bei Kultivierungen von *C. bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie 2-Dodecanol, 2-Tetradecanol, Speziol 936U, 2-Ethyl-1-Hexanol und Rilanit G16 als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h.

Substrat-kombination	Saccharose/ 2-Dodecanol	Saccharose/2-Tetradecanol	Glucose/ Speziol 936U	Saccharose/ Speziol 936U
Ertragskoeffizient $Y_{P/S}$	0,010	0,060	0,053	0,086
Substrat-kombination	Glucose/ 2-Ethyl-1-Hexanol	Saccharose/ 2-Ethyl-1-Hexanol	Glucose/ Rilanit G16	Saccharose/ Rilanit G16
Ertragskoeffizient $Y_{P/S}$	0,017	0,003	0,046	0,040

Abb. 18 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der Sophoroselipid-Produkte aus den Fettalkoholkultivierungen.

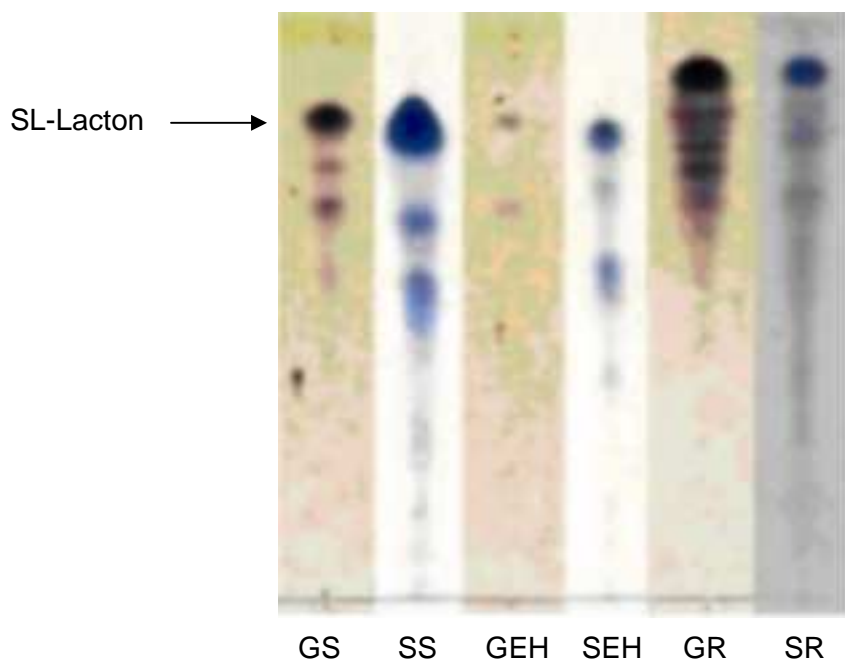


Abb. 18: Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als hydrophilen C-Quellen sowie Speziol 936U (S), 2-Ethyl-1-Hexanol (EH), Rilanit G 16 (R), 2-Dodecanol (D) und 2-Tetradecanol (T) als hydrophoben Co-Substraten produzierten SL. Bedingungen: stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure.

Aus Abb. 18 geht hervor, dass die meisten Substratkombinationen das bekannte Produktmuster ergeben. Eine Ausnahme stellen die Kultivierungen mit Rilanit G16 dar. Hier zeigt sich ein deutlich vielfältigeres Bandenmuster, v. a. in der Auftrennung des Produkts aus Glucose und Rilanit G 16. Auch die Bandenmuster der Auftrennung mit reversed-phase-Material unterschieden sich deutlich (Ergebnis nicht

dargestellt). Zur genaueren Charakterisierung wurden die Produkte der Kultivierungen mit Glucose und Rilanit G16 sowie Saccharose und 2-Ethyl-1-Hexanol einer GC-MS-Analyse nach saurer Methanolyse unterzogen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tab. 5 dargestellt.

Das Produkt der Kultivierung mit Saccharose und 2-Ethyl-1-Hexanol zeigt keine besondere Zusammensetzung hinsichtlich ihrer Lipidkomponenten. Hier liegt zum größten Teil die für *C. bombicola* bekannte Produktzusammensetzung mit gesättigten oder einfach ungesättigten Lipidkomponenten der Kettenlängen C₁₆ oder C₁₈ mit einer Hydroxy-Gruppe in (ω-1)- oder ω-Position vor. Das Produkt aus der Kultivierung mit Glucose und Rilanit G 16 jedoch weist tatsächlich zahlreiche ungewöhnliche Lipidkomponenten auf. Bei der Hauptkomponente (22,3 %) handelt es sich um 2-Hexyl-1-Decanol, die Hauptkomponente von Rilanit G16, die also offensichtlich unverändert in das SL-Molekül eingebaut worden ist. Mit weiteren 5 % kommt die zur Säure oxidierte Form vor, 3,4 % machen die Di-Hydroxy-Variante dieses verzweigten Alkohols aus. Auch eine ungewöhnlich kurze Hydroxy-Fettsäure mit der Kettenlänge C₁₂ kommt mit 19 % mit relativ hohem Anteil vor.

Tab. 5: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten in SL aus der Kultivierung von *C. bombicola* ATCC 22214 mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen und Rilanit G16 sowie 2-Ethyl-1-Hexanol als Co-Substraten.

Glucose/ Rilanit G16		Saccharose/ 2-Ethyl-1-Hexanol	
Lipidkomponente	Anteil [%]	Lipidkomponente	Anteil [%]
2-C6-C10-1-ol	22,3	FS 17-OH-C 18:1	38,3
FS OH-C 12:0	19,0	FS 17-OH-C 18:0	29,8
FS 17-OH-C 18:1	18,2	FS 15-OH-C 16:0	7,0
FS 17-OH-C 18:0	14,5	FS 16-OH-C 16:0	6,0
2-C6-C10-1-ol-10-säure	5,0	FS 18-OH-C 18:1	5,5
2-C6-C10-diol	3,4	FS 16,17-DiOH-C 18:0	2,8
FS OH-C 14:0	2,9	FS 17-OH-C 18:0	1,4
FS 16-OH-C 16:0	2,8	FS 18-OH-C 18:0	1,0
FS 15-OH-C 16:0	2,7	nicht identifiziert	8,6
2-C6-C10-diol	1,6		
FS 18-OH-C 18:1	1,4		
2-C6-C10-diol	1		
2-C6-C10-1-ol Acetat	1		
2-C15-ol	1		
FS 18-OH-C 18:0, verzweigt	0,7		
FS 16-OH-C 17:0	0,5		
FS 12-OH-C 18:1	0,3		
C-14-ol, verzweigt	0,3		
FS 18-OH-C 18:0	0,2		
nicht identifiziert	1,5		

Um die genaue Molekülstruktur des Glycolipids aufklären zu können, wurden zunächst aus dem Rohprodukt die Hauptkomponenten durch Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie gereinigt. Dadurch konnten zwei der Peaks des Rohextraktes soweit aufgereinigt werden, dass eine NMR-MS-Analytik mit ihnen durchgeführt werden konnte. Abb. 19 zeigt das Dünnschichtchromatogramm des Rohextraktes und der gereinigten Komponenten SL-S1 und SL-S3.

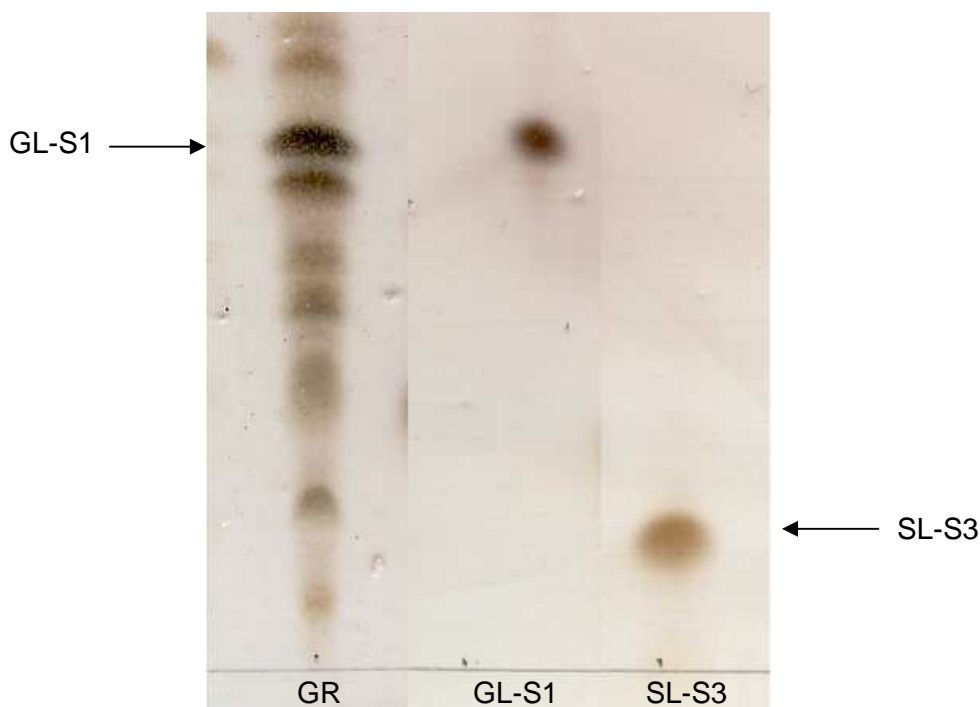


Abb. 19: Dünnschichtchromatogramme des mit Glucose und Rilanit G 16 hergestellten Rohproduktes (GR) sowie dessen Hauptkomponenten GL-S1 und SL-S3 nach Aufreinigung durch MPLC. Bedingungen: stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure.

Zur Strukturaufklärung wurden eindimensionale ^1H - und ^{13}C -Spektren und zweidimensionale COSY- und HMBC-Spektren sowie Elektronenspray-Massenspektren aufgenommen. Anhand von Korrelation der ^1H -COSY-Spektren von GL-S1 konnte festgestellt werden, dass das untersuchte Molekül ein einziges Zuckermolekül enthält, welches aufgrund der Kopplungskonstanten (s. Tab. 6) aus dem eindimensionalen ^1H -Spektrum als β -Glucopyranose identifiziert werden konnte. Aus demselben Spektrum konnte man ersehen, dass das Molekül ein 2-Alkylsubstituiertes Alkan-1-ol enthält. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das anomere Proton H-1 im HMBC-Spektrum eine starke dreiwertige Korrelation mit dem C-1'-Atom des Alkohol zeigt. Weitere Korrelationen gab es in diesem Spektrum zwischen den Protonen H-1'A und H-1'B mit dem C-1-Atom. Die Massenspektrometrie-Daten zeigten Ionen der Massenzahlen m/z 427,31 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ sowie 831,62 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$. Diese Daten in Verbindung mit der Identität der Ausgangssubstrate zeigen, dass es sich bei GL-S1 um 1-O- β -Glucopyranosyl-2-hexyldecanol handelt. Die Strukturformel des so analysierten Moleküls ist in Abb. 20 dargestellt.

Tab. 6: ^1H and ^{13}C NMR-Daten, aufgenommen in 70:30 $\text{CDCl}_3\text{:CD}_3\text{OD}$ von 1-O- β -Glucopyranosyl-2-Hexyldecan-1-ol aus der Kultivierung von *C. bombicola* mit Glucose und Rilanit G16.

		δ_{H}	J	δ_{C}
Zucker	1	4.26 d	(1-2) 7.8	103.6 d
	2	3.25 dd	(2-3) 9.3	73.9 d
	3	3.43-3.39 m	(3-4) nd	76.7 d
	4	3.43-3.39 m	(4-5) 9.5	70.5 d
	5	3.28 ddd	(5-6A) 2.9	76.1 d
	6A 6B	3.87 dd 3.76 dd	(5-6B) 5.0 (6A-6B) 11.9	62.1 t
Alkylrest	1'A 1'B	3.80 dd 3.40 dd	(1'A-1'B) 9.5 (1'A-2') 6.1	73.7 t
	2'	1.62 m	(1'B-2') 6.1	38.5 d
	3', 3''	1.40-1.25 m		31.3 t
	4', 4''	1.40-1.25 m		27.0, 26.9 t
	5', 5'' 6', 7'	1.40-1.25 m		30.3, 29.9, 29.8, 29.5 t
	8', 6''	1.40-1.25 m		32.1 t
	9', 7''	1.40-1.25 m		22.8 t
	10', 8''	0.89 t	(9'/8''-10'/7'') 7.0	14.1 q

Weiterhin zeigte sich nach der Strukturaufklärung, dass es sich bei SL-S1 um ein bekanntes Molekül mit einer der in Abb. 2 (S. 7) gezeigten Strukturen handelt, nämlich um das Molekül, das in der offenkettigen Säureform vorliegt.

Durch Verwendung von Rilanit G16 als Co-Substrat ist es also tatsächlich gelungen zumindest eine neue interessante Glycolipidverbindung (Abb. 20) herzustellen, wobei es sich allerdings um ein Glucoselipid an Stelle eines Sophoroselipides handelt.

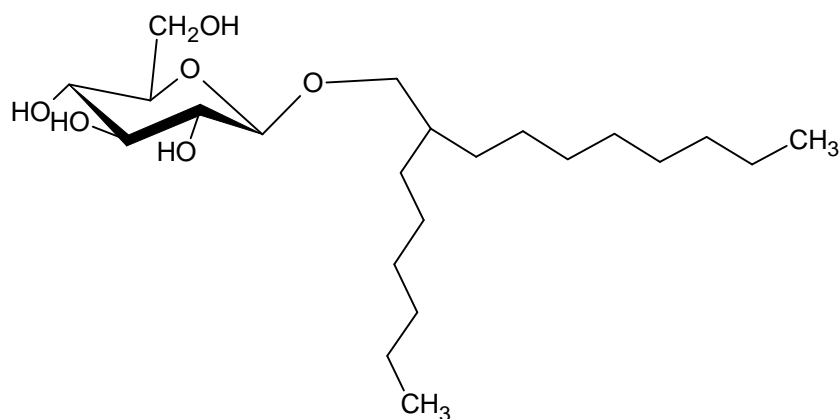


Abb. 20: Strukturformel der Hauptkomponente des durch Kultivierung von *C. bombicola* ATCC 22214 mit Glucose und Rilanit G16 hergestellten Glycolipid-Gemisches.

3.1.4. Fettsäuren als Co-Substrate

Ölsäure ist ein aus der Literatur bekanntes (u. a. Asmer et al. 1988, Rau et al. 1996) Co-Substrat zur Produktion von SL. Deshalb sollte diese neben einer weiteren Fettsäure, Erukasäure, als Substrat verwendet werden. Zur Erläuterung sind in Abb. 21 die Strukturformeln dieser Fettsäuren dargestellt.

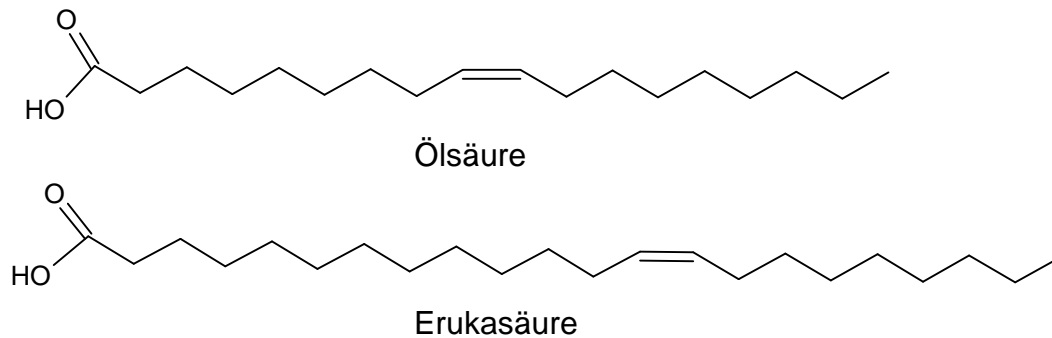


Abb. 21: Strukturformeln von Ölsäure und Erukasäure.

Die Ergebnisse der Kultivierungen mit diesen Fettsäuren sind in Abb. 22 dargestellt.

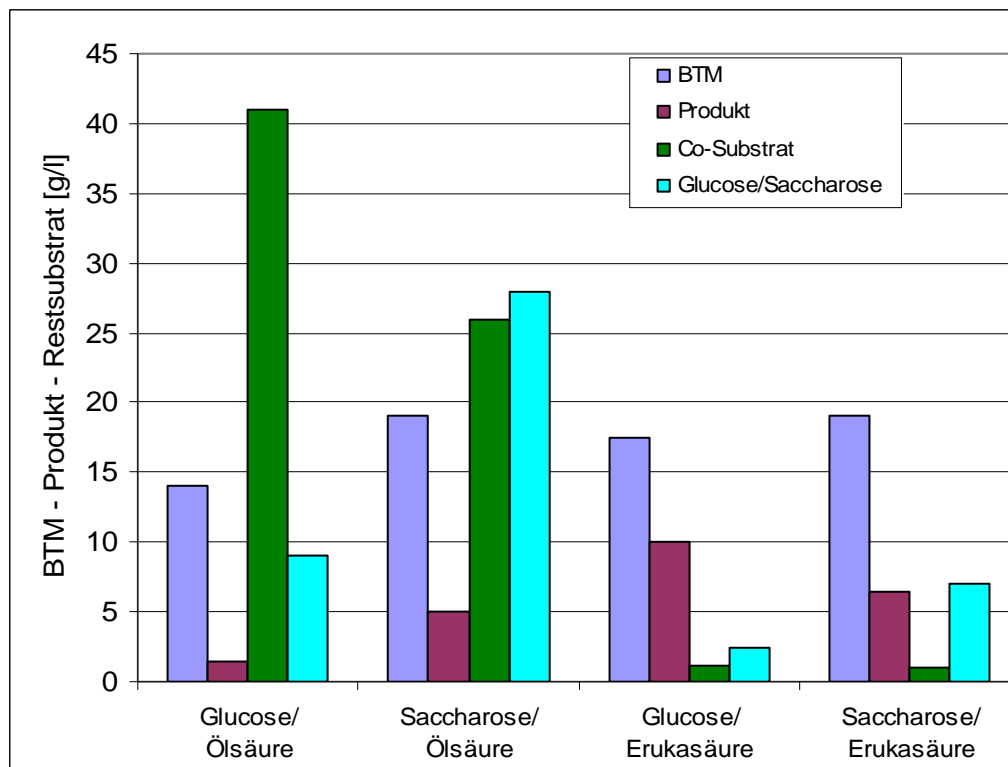


Abb. 22: Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Ölsäure und Erukasäure als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h.

Überraschenderweise wurden bei der Verwendung von Ölsäure als Co-Substrat geringere Konzentrationen an SL (1,5 bzw. 5 g/l) erzielt als bei den Kultivierungen mit Erukasäure (6,5 und 10 g/l). Tab. 7 fasst die Ertragskoeffizienten der Kultivierungen mit Fettsäuren zusammen.

Tab. 7: Überblick über die erzielten Ertragskoeffizienten bei Kultivierungen von *C. bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Ölsäure und Erukasäure als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h.

Substrat-kombination	Glucose/ Ölsäure	Saccharose/ Ölsäure	Glucose/ Erukasäure	Saccharose/ Erukasäure
Ertragsko- effizient $Y_{P/S}$	0,010	0,033	0,066	0,043

In Abb. 23 sind die dünnschichtchromatographischen Auftrennungen der einzelnen SL-Produkte dargestellt.

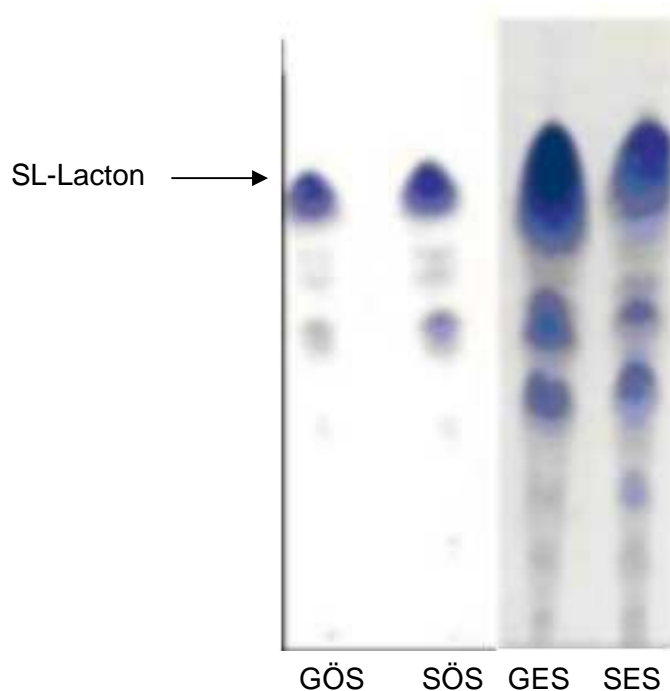


Abb. 23: Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als hydrophilen C-Quellen sowie Ölsäure(ÖS) und Erukasäure (ES) als hydrophoben Co-Substraten produzierten SL. Bedingungen: stationäre Phase: Kieselgel 60 F_{254} , mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure.

Da hier keine auffälligen Bandenmuster zu erkennen waren, wurden keine weiteren Strukturanalysen dieser Produkte durchgeführt.

3.1.5. Pflanzliche Öle als Co-Substrate

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Produktion von SL, die die höchsten Produktkonzentrationen erzielen konnten, nutzten Pflanzenöle als Substrate (Daniel et al. 1998, Rau et al. 2001, Pekin et al. 2005). Deshalb wurden auch in dieser Arbeit verschiedene Pflanzenöle auf ihre Eignung als Co-Substrate untersucht, um Produktionssteigerungen zu erzielen oder neuartige Produkte herstellen zu können. Die dabei verwendeten Öle waren Sonnenblumenöl (SBO), Calendulaöl, Senföl und Rapsöl. Das Rapsöl wurde sowohl als erukasäurereiches (Rapsöl ER) als auch -armes (Rapsöl EA) Öl verwendet. In den Abb. 24 und 25 sind die mit Pflanzenölen erzielten Ergebnisse dargestellt.

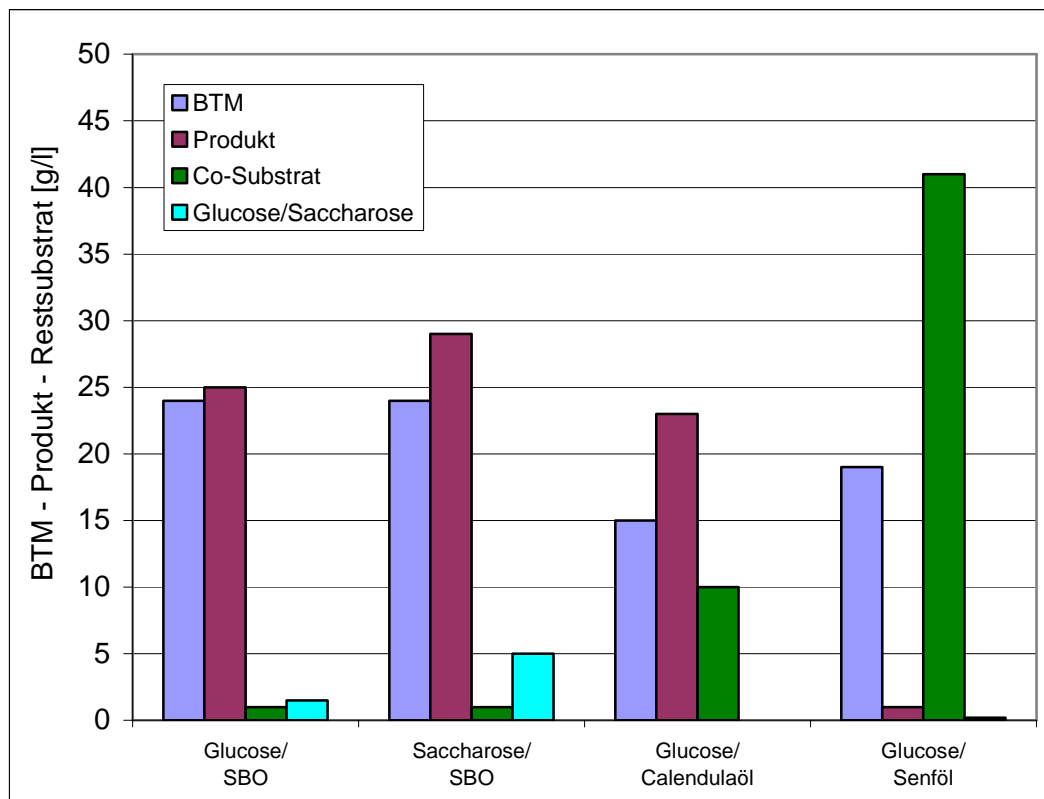


Abb. 24: Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Sonnenblumenöl (SBO), Calendulaöl und Senföl als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h (und nach 96 h bei der Kultivierung auf Glucose/Calendulaöl).

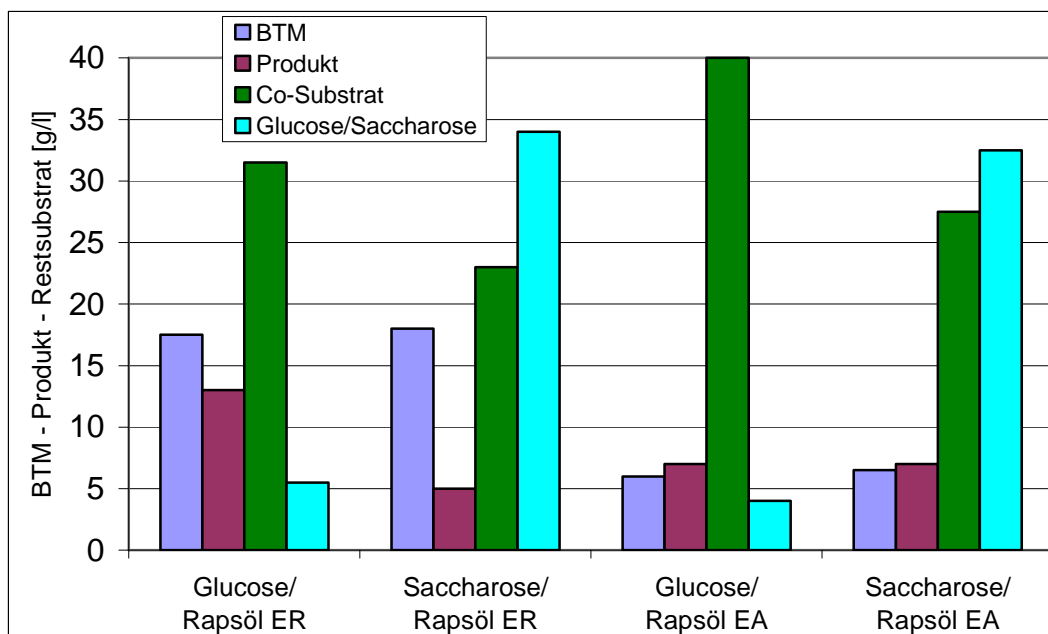


Abb. 25: Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Rapsöl ER (reich an Erucasäure) und Rapsöl EA (arm an Erucasäure) als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h.

Der geringste Produktgehalt von ca. 1 g/l wurden bei Verwendung von Senföl als Co-Substrat erzielt. Auch die Kultivierungen mit Rapsöl ergaben keine hohen SL-Konzentrationen, sieht man von der Kombination Glucose / Rapsöl ER ab, mit der 13 g/l SL produziert werden konnten. Die Kombination Glucose / Calendulaöl erzielte mit 23 g/l SL ein recht gutes Ergebnis. Durch die Verwendung von SBO ließen sich wie erwartet gute Ergebnisse von 25 bzw. 28,5 g/l SL erzielen. Tab. 8 fasst die Ertragskoeffizienten der Kultivierungen mit Pflanzenölen noch einmal zusammen.

Abb. 26 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der Auftrennung der mit pflanzlichen Ölen produzierten SL. Da in dieser Abbildung die Produkte der Kultivierung mit Calendulaöl auffällige Spots ergaben, wurden diese per GC-MS nach saurer Methanalyse untersucht. Als Referenz wurde dazu auch das Produkt der Kultivierung mit Glucose und SBO analysiert. Die dabei festgestellten Lipidzusammensetzungen sind Tab. 9 zu entnehmen.

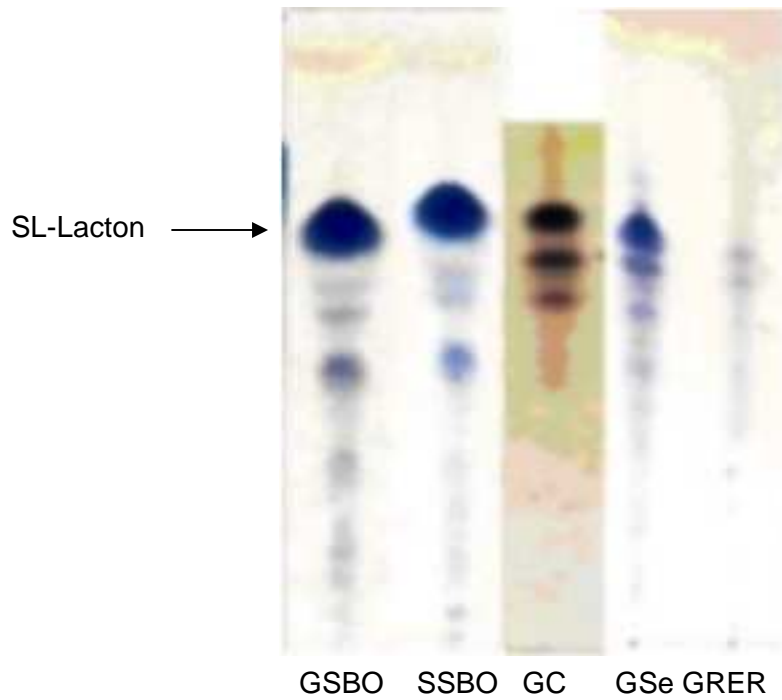


Abb. 26: Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als hydrophilen C-Quellen sowie Sonnenblumenöl (SBO), Calendulaöl (C), Senföl (Se) und erukasäurereichem Rapsöl (RER) als hydrophoben Co-Substraten produzierten SL. Bedingungen: Normalphase (NP): stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure.

Tab. 8: Überblick über die erzielten Ertragskoeffizienten bei Kultivierungen von *C. bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie SBO, Calendulaöl, Senföl sowie Rapsöl ER (reich an Erukasäure) und Rapsöl EA (arm an Erukasäure) als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8$ d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h (und nach 96 h bei der Kultivierung auf Glucose/Calendulaöl).

Substratkombination	Ertragskoeffizient $Y_{P/S}$
Glucose / SBO	0,17
Saccharose / SBO	0,19
Glucose / Calendulaöl	0,13
Glucose / Senföl	0,007
Glucose / Rapsöl ER	0,086
Saccharose / Rapsöl ER	0,033
Glucose / Rapsöl EA	0,046
Saccharose / Rapsöl EA	0,046

Tab. 9: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten in SL aus der Kultivierung von *C. bombicola* ATCC 22214 mit Glucose als hydrophilen C-Quellen sowie SBO und Calendulaöl als Co-Substraten.

Glucose/ SBO		Glucose/ Calendulaöl	
Lipidkomponente	Anteil [%]	Lipidkomponente	Anteil [%]
FS 17-OH-C 18:1	82,7	FS 17-OH-C 18:0	25,2
FS 17-OH-C 18:0	11,7	FS 17-OH-C 18:1	21,7
FS 18-OH-C 18:1	2,1	FS 18-OH-C 18:2	19,6
FS 15-OH-C 16:0	1,0	FS 17-OH-C 18:2	9,1
FS 18-OH-C 18:2	0,8	FS 15-OH-C 16:0	4,0
FS 16-OH-C 16:0	0,6	FS 18-OH-C 18:1	3,9
FS 17-OH-C 18:2	0,5	FS 16-OH-C 16:0	3,1
FS 16-OH-C 18:1	0,2	FS 18-OH-C 18:0	1,1
FS 18-OH-C 18:0	0,1	FS 12-OH-C 18:1	0,6
FS 15-OH-C 16:1	0,1	nicht identifiziert	10,4
FS 16-OH-C 17:0	0,1		
nicht identifiziert	0,2		

Es zeigte sich, dass die Haupt-Lipidkomponente der Kultivierung mit SBO (ω -1)-OH-Ölsäure ist (82,7 %). Bei den meisten übrigen Lipidkomponenten des SL aus SBO handelt es sich um die bekannten gesättigten oder einfach ungesättigten Hydroxyfettsäuren der Kettenlängen C_{16} oder C_{18} mit der Hydroxy-Gruppe in (ω -1)- oder ω -Position. Zwar ist der Anteil der hydrophoben Reste bei der Kultivierung mit Calendulaöl, dessen Hauptfettsäure mit 55-60% die Calendulasäure ist (Abb. 27), mit

mehrfach ungesättigten Fettsäuren größer als mit SBO (28,7 % gegen 1,3 %), allerdings tauchen keine dreifach ungesättigten Fettsäuren auf.

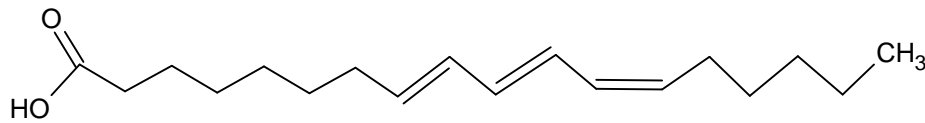


Abb. 27: Strukturformel von Calendulasäure

Aufgrund der guten Erträge der Kultivierungen mit SBO als Co-Substrat wurden die anschließend durchgeführten Kultivierungen zum größten Teil mit der Substratkombination Glucose/SBO durchgeführt, auch da SBO ein sehr günstiger Rohstoff ist.

3.2. Tests verschiedener Separationstechniken für den Sophoroselipidbildner *Candida bombicola*

Zur Etablierung eines biotechnologischen Verfahrens mit integrierter Zellrückhaltung und zur Vereinfachung der Aufarbeitung von SL nach der Kultivierung mit *C. bombicola* sollten verschiedene Zellabtrennverfahren auf ihre Eignung hin untersucht werden. Diese waren Ultraschallabtrennung durch „Ultrasonically Enhanced Settling“ (UES) und Querstrommembranfiltration mit Membranen unterschiedlicher Porengrößen (Mikro- und Ultrafiltration).

3.2.1. Ultraschall-Zellabtrennung mit *Candida bombicola*

Aus früheren Arbeiten (Radel et al. 2000, Radel 2002) ist bekannt, dass Hefezellen der Art *Saccharomyces cerevisiae* durch Ultraschalltrennverfahren sehr gut aus wässrigen Suspensionen abgetrennt werden können. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, dieses Verfahren auf *C. bombicola* zu übertragen.

3.2.1.1. Grundlegende Untersuchungen zur Durchführbarkeit der Ultraschall-Zellabtrennung mit *Candida bombicola*

Zunächst wurden grundlegende Experimente angestellt, ob die Zelltrennung von *C. bombicola* überhaupt mittels UES durchgeführt werden kann. Dazu wurde eine Schüttelkultivierung von *C. bombicola* mit Glucose als alleiniger C-Quelle für 48 h durchgeführt. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch UES aufgetrennt, Abb. 28 zeigt ein Verfahrensschema.

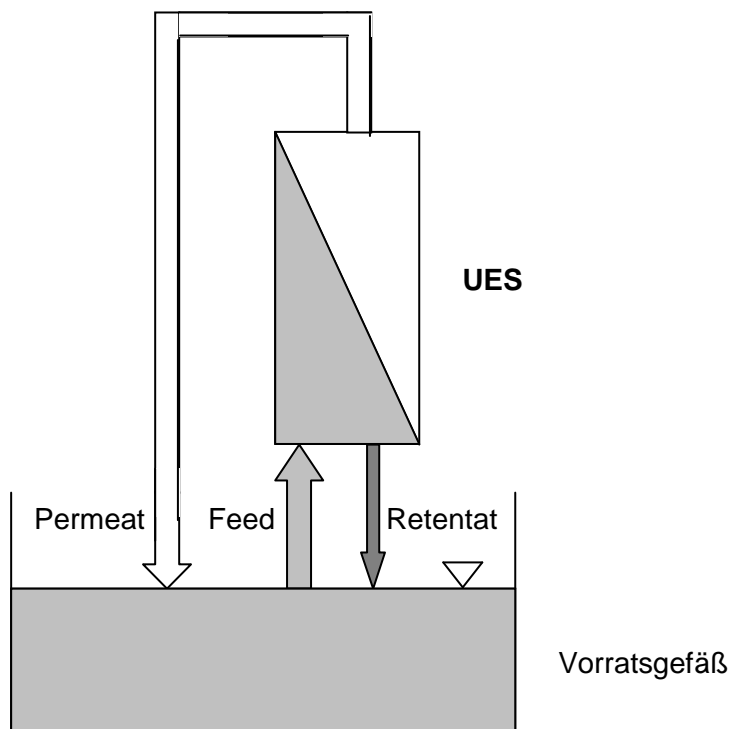


Abb. 28: Verfahrensschema der im Kreislauf betriebenen Auftrennung von *C. bombicola*-Suspension.

Aus dem Vorratsgefäß wurde der Feed-Strom entnommen und dem UES-Gerät von unten zugeführt. Dort wurde dieser in einen Retentat- und einen Permeatstrom aufgeteilt. Die Zellen werden auf ihrem Weg durch die Ultraschallkammer zurückgehalten und sinken nach unten, so dass der Retentatstrom, der an der Unterseite des Gerätes entnommen wird, nahezu alle Zellen enthielt. Der Permeatstrom sollte nahezu zellfrei sein und wurde an der Oberseite des Gerätes abgezogen. Die gesamte Anlage wurde im Kreislauf betrieben, so dass sich die zeitliche Zellkonzentration im Vorratsgefäß nicht änderte. Den einzelnen Teilströmen Feed, Retentat und Permeat wurden nach Erreichen eines stabilen Zustandes Proben entnommen und auf ihre Biomassekonzentration untersucht. Die

Geschwindigkeiten der einzelnen Ströme wurden durch regulierbare Pumpen gewählt, so dass unterschiedliche Verhältnisse der einzelnen Ströme und unterschiedliche Gesamtströmungsgeschwindigkeiten in Hinsicht auf ihren Einfluss auf die Trennleistung untersucht werden konnten.

Die Experimente wurden mit unterschiedlichen UES-Geräten durchgeführt, die sich durch ihre Größe und damit ihre Kapazität unterschieden. Es kamen ein 10 l/d-Gerät und ein 50 l/d-Gerät zum Einsatz.

Abb. 29 zeigt die Aufnahme der Ultraschalltrennkammer eines 10 l/d-Trenngerätes beim Trennvorgang von *C. bombicola* -Zellen.



Abb. 29: Photographie des Trennvorgangs von *C. bombicola*-Zellsuspension durch ein 10 L/d Ultraschalltrenngerät. Die Aufnahme zeigt die Vorgänge in der Trennkammer.

Deutlich zu erkennen ist die Ausprägung vertikaler Linien durch die Zusammenlagerung der Zellen in den Knotenebenen des stehenden Ultraschallfeldes. Außerdem ist die Ausprägung eines vertikalen Konzentrationsgefälles an Zellen gut zu erkennen, d. h. dass im unteren Bereich der Trennkammer eine relativ hohe Zellkonzentration vorliegt; das Medium erscheint dort stark getrübt. In den höheren Bereichen der Trennkammer nehmen sowohl die Trübung des Mediums als auch die Zahl und Dicke der sichtbaren vertikalen Linien ab. In dem dargestellten Versuch konnte die Zellkonzentration von 11,5 g/l im Feed auf 0,8 g/l im Permeat reduziert werden, so dass eine Trennleistung von 93 % erzielt

werden konnte. Damit ist nachgewiesen, dass die Ultraschallzelltrennung bei Suspensionen von *C. bombicola* grundsätzlich anwendbar ist.

Um eine problemlose Anwendung des UES in einem größeren Maßstab zu ermöglichen, wurden auch Experimente mit einem 50 l/d-Trenngerät durchgeführt. Abb. 30 zeigt die Photographie der Ultraschalltrennkammer des 50 l/d-Trenngerätes während des Trennvorgangs.

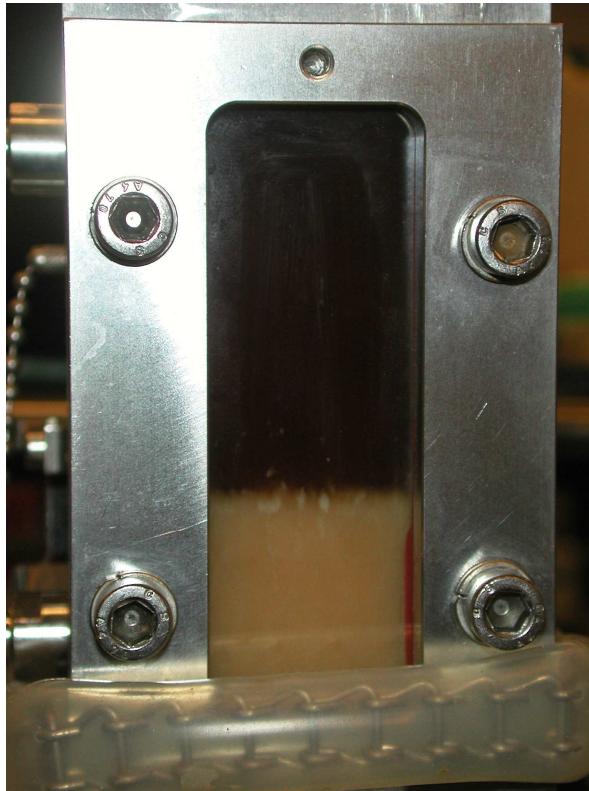


Abb. 30: Photographie des Trennvorgangs von *C. bombicola*-Zellsuspension durch ein 50 l/d Ultraschalltrenngerät. Die Aufnahme zeigt die Vorgänge in der Trennkammer.

Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen aus der Feed-Suspension im unteren Bereich der Trennkammer zurückgehalten werden. Mit diesem Gerät ist eine sehr viel schärfere Auftrennung in einen unteren, trüben Bereich zu erkennen, der eine hohe Zellkonzentration aufweist, und in einen klaren, oberen Bereich niedriger Zellkonzentration. Eine ähnlich deutliche Ausprägung der vertikalen Linien wie im 10 l/d-Gerät kann hier nicht beobachtet werden, da sich der Aufbau der Trenngeräte unterscheidet: Während das 10 l/d-Gerät so aufgebaut ist, dass sich das Ultraschallfeld orthogonal zur Betrachtungsebene aufbaut, liegt es im 50 l/d-Gerät parallel zur Betrachtungsebene.

Dennoch kann auch dieses Gerät zur Zellabtrennung von *C. bombicola*-Zellsuspensionen verwendet werden. Die erreichbare Trennleistung ist hier sogar

noch besser, da die Zellkonzentration von 17,3 g/l im Feed auf 0,2 g/l im Permeat gesenkt wurde, was einer Trennleistung von 98,9 % entspricht.

3.2.1.2. Einfluss der Ultraschalltrennung auf die Überlebensfähigkeit von *Candida bombicola*-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Zelltrennung durch das verwendete UES-Verfahren unerwünschte negative Auswirkungen auf die Zellvitalität hat, sollte diese durch selektive Fluoreszenzfärbung bestimmt werden. Dazu wurden die Farbstoffe Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) verwendet. FDA wird in die Zellen aufgenommen, wo die Acetatreste nur in lebenden Zellen von Esterasen abgespalten werden. Das so gebildete Fluorescein zeigt in UV-Licht eine intensiv grüne Färbung, tote Zellen zeigen diese nicht. Die Färbung mit PI beruht auf dem Prinzip, dass die Membranen von nekrotischen oder toten Zellen permeabel sind, so dass PI-Moleküle in die Zelle eindringen können. Sie interkalieren anschließend in die DNA der Zelle und lassen somit die Zellkerne rot fluoreszieren. Dadurch sollten lebende Zellen im UV-Licht grün leuchten, tote hingegen rot.

Erste Versuche mit ruhenden Zellen von *Candida bombicola* zeigten aber, dass die FDA-Lebendfärbung in diesem System nicht funktioniert, da die Zellen sich nicht anfärben ließen. Da die Anfärbung nekrotischer und toter Zellen mit PI hingegen gut funktionierte, wurde eine Einfachfärbung mit PI durchgeführt, um die Anteile an lebenden Zellen zu bestimmen.

Dazu wurden die Anteile an lebensfähigen Zellen in allen Teilströmen, also Feed, Filtrat und Permeat, bei einer UES-Zelltrennung mit einem 10 l/d-Gerät bestimmt. Auch hier wurden Zellsuspensionen aus Schüttelkolbenkultivierungen von *C. bombicola* verwendet. Der Versuchsaufbau entsprach im wesentlichen dem aus Abb. 28 (S.62), allerdings wurde die Anlage nicht im Kreislauf betrieben, um zu verhindern, dass eventuell durch Ultraschall beschädigte Zellen wieder in das Vorratsgefäß zurück überführt werden. Es stellte sich heraus, dass die Zellvitalität durch UES nicht negativ beeinflusst wurde (s. Tab. 10). In zwei Experimenten weichen die gemessenen Werte der Zellvitalität für Filtrat und Retentat, also diejenigen Teilströme, die Zellen nach der Ultraschallbehandlung enthalten, nur geringfügig von den Werten des Feedstroms ab.

Tab. 10: Anteile überlebender Zellen in unterschiedlichen Teilströmen bei Ultraschalltrennvorgängen. Der Lebendzellanteil wurde durch PI-Färbung und anschließendes Auszählen bestimmt. A und B bezeichnen unterschiedliche Experimente.

Teilstrom	Anteil an lebenden Zellen[%]	
	A	B
Feed	91,2	87,3
Filtrat	90,7	87,1
Retentat	91,6	86,2

3.2.1.3. Einfluss verschiedener Faktoren auf die Trennleistung

Um die Zelltrennung von *Candida bombicola* durch UES näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Größen im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Trennleistung untersucht. Diese waren Durchsatz, Zellkonzentration und Ölkonzentration. Dazu wurde das 50 l/d-Gerät verwendet.

3.2.1.3.1. Einfluss des Permeat-Durchsatzes auf die Trennleistung

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss der Permeat-Durchsatz auf die Trennleistung hat. Dazu wurden eine Zellsuspension aus einer Schüttelkultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose als alleiniger C-Quelle mit einer Zellkonzentration von 12,2 g/l durch UES getrennt. Es wurden verschiedene Durchflüsse gewählt und die Zellkonzentrationen der Filtratströme bestimmt. Die daraus berechneten Trennleistungen sind in Abb. 31 in Abhängigkeit vom jeweiligen Durchsatz aufgetragen.

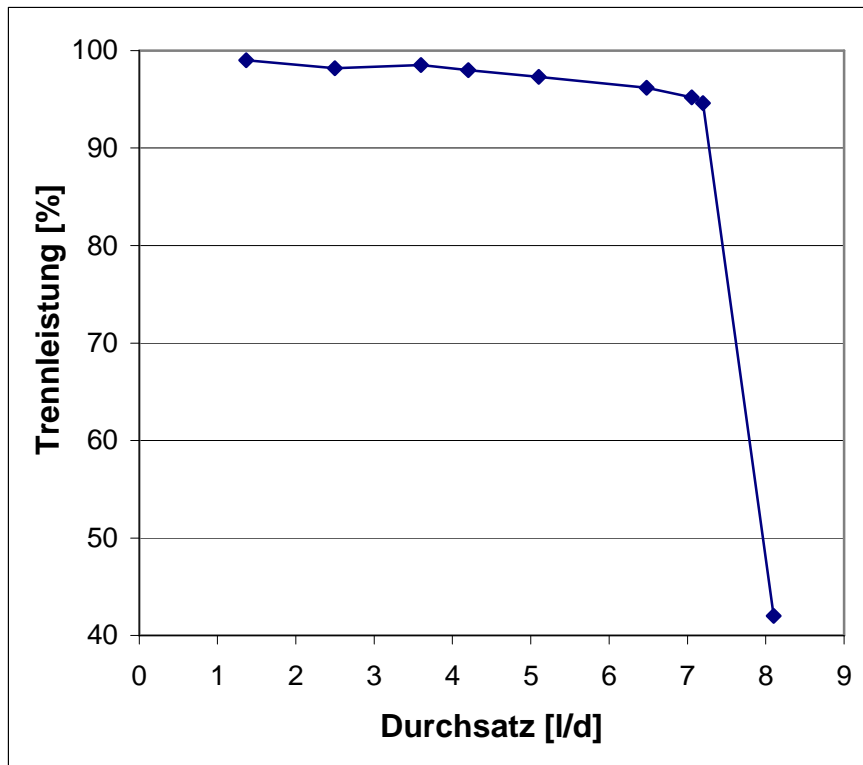


Abb. 31: Trennleistung des 50 l/d-Ultraschalltrenngerätes für *C. bombicola*-Zellen in Abhängigkeit vom Permeat-Durchsatz.

In Abb. 31 ist zu erkennen, dass die Trennleistung bei geringerem Durchsatz nur wenig, aber kontinuierlich von 99 % (1,4 l/d Durchsatz) auf 94,6 % (7,2 l/d Durchsatz), sinkt. Nach dem Erreichen des Schwellenwertes von 7,2 l/d nimmt sie allerdings rapide ab und fällt bei weiter steigendem Durchsatz auf einen Wert von auf ca. 40 % bei einem Durchsatz von 8,1 l/d ab.

3.2.1.3.2. Einfluss der Zellkonzentration auf die Trennleistung

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Zellkonzentration auf die Trennleistung durch UES hat, wurde eine Zellsuspension von *Candida bombicola* aus einer Schüttelkultivierung mit Glucose als alleiniger C-Quelle mit einer Zellkonzentration von 13,2 g/l verwendet. Davon wurden mehrere Verdünnungen hergestellt und die Suspensionen einer Ultraschalltrennung bei einem Durchsatz von 2,5 l/d unterzogen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 32 dargestellt.

Aus Abb. 32 geht hervor, dass die Trennleistung mit sinkender Zellkonzentration abnimmt.

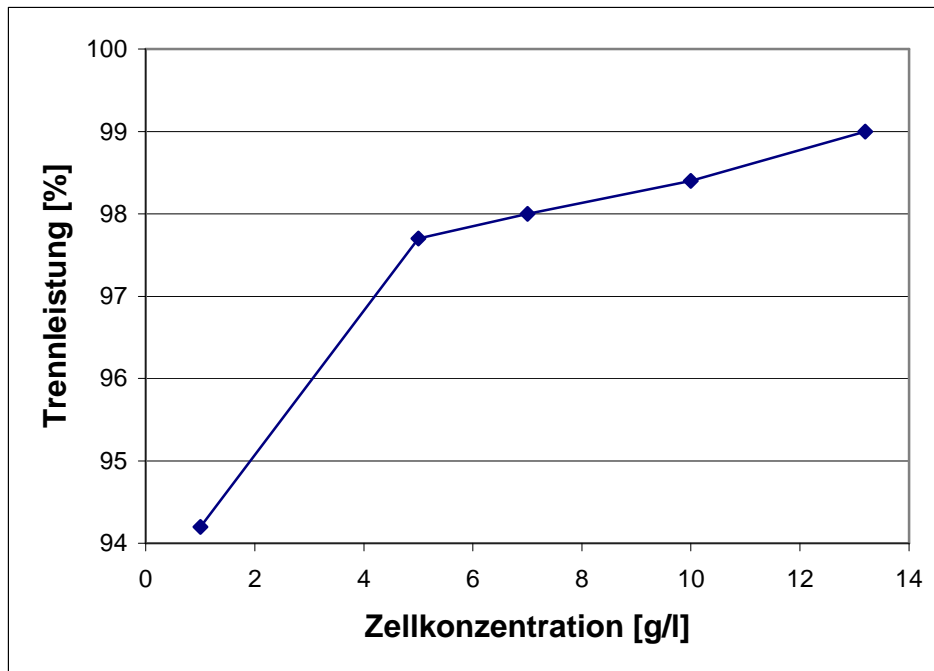


Abb. 32: Trennleistung des 50 l/d-Ultraschalltrenngerätes für *C. bombicola*-Zellen in Abhängigkeit von der Zellkonzentration. Der Durchsatz betrug 2,5 l/d.

3.2.1.3.3. Weitere Einflussgrößen für die Trennleistung

Um das Ultraschalltrennverfahren im Hinblick auf seine Leistungsfähigkeit mit *Candida bombicola* zu charakterisieren, wurden bisher nur gut zu kontrollierende Einflussgrößen wie Zellkonzentration und Durchsatz untersucht. Die Produktion von Sophoroselipiden mit *C. bombicola* findet aber in einem komplexeren System statt. So werden neben dem Substrat Glucose zusätzlich hydrophobe Substrate wie zum Beispiel Pflanzenöle benötigt. Außerdem werden Sophoroselipide in so großen Mengen produziert, dass sie im Verlauf des Prozesses als Kristalle ausfallen. Das bedeutet, dass reale Kultivierungssuspensionen aus einem mehrphasigen System aus wässrigem Medium, nicht mischbaren hydrophoben Substraten, Zellen und Produktkristallen sowie Luftblasen bestehen. Diese Komponenten können allesamt einen Einfluss auf den Ultraschalltrennvorgang haben, wobei das Vorhandensein von Luftblasen durch die Verwendung eines geeigneten Aufbaus beim Trennvorgang ausgeschlossen sein muss, da sich ansonsten keine stabilen Agglomerate bilden können (Benes et al. 2001).

Als einzige Komponente realer Kultivierungssuspensionen wurde bislang die Zellkonzentration hinsichtlich ihres Einflusses auf den Ultraschalltrennvorgang

quantifiziert. Als nächstes sollte deshalb die Konzentration an hydrophobem Co-Substrat untersucht werden. Diese Co-Substrate sind unerlässlich zur Produktion von Sophoroselipiden, da nur durch ihre Verfügbarkeit die Produktion in hohen Konzentrationen ($> 100 \text{ g/l}$) stattfinden kann. Als geeignete Co-Substrate haben sich dabei Pflanzenöle und ihre Komponenten wie z.B. SBO und Ölsäure, herausgestellt. Deshalb sollte der Einfluss von hydrophoben Substraten auf den Ultraschalltrennvorgang durch Zugabe unterschiedlicher Mengen von SBO zum Testsystem untersucht werden. Dazu wurden wiederum Zellsuspensionen von *Candida bombicola* aus einer Schüttelkultivierung mit Glucose als alleiniger C-Quelle mit einer Zellkonzentration von $12,2 \text{ g/l}$ verwendet. Abb. 33 zeigt den Einfluss der Zugabe unterschiedlicher Mengen SBO auf die Trennleistung bei einem Durchsatz von $2,5 \text{ l/d}$.

Ohne Anwesenheit von Öl ist die Trennleistung mit einem Wert von 98% noch sehr gut. Allerdings senken schon relativ geringe Mengen Öl von 10 g/l die Trennleistung deutlich, wobei der Wert mit 91% immer noch relativ hoch ist. Die weitere Zugabe von Öl bewirkt eine kontinuierliche Abnahme, bis bei einer Ölkonzentration von 37 g/l eine Trennleistung von nur noch 31% erreicht wird.

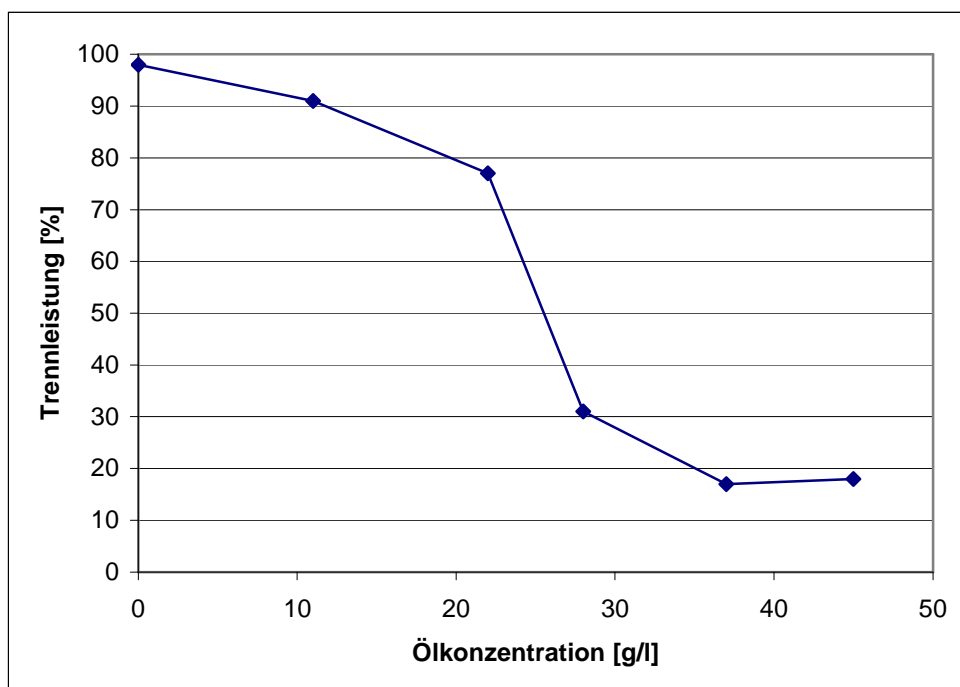


Abb. 33: Trennleistung des 50 l/d -Ultraschalltrenngerätes für *C. bombicola*-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an SBO. Die Zellkonzentration betrug $12,2 \text{ g/l}$, der Durchsatz $2,5 \text{ l/d}$.

Die letzte Komponente, deren Einfluss auf die Ultraschalltrennung untersucht werden sollte, war die Konzentration an Sophoroselipiden. Diese werden im Laufe des Produktionsprozesses gebildet und fallen beim Übersteigen einer gewissen Konzentration als Kristalle aus. Der Wert dieser kritischen Konzentration hängt von verschiedenen Parametern ab: Temperatur, Konzentration anderer gelöster Stoffe oder Konzentration an Co-Substrat. Deshalb ist es nicht einfach, die Auswirkungen unterschiedlicher Sophoroselipidkonzentrationen im realen *C. bombicola*-System zu quantifizieren. Aus diesem Grunde wurden Versuche mit realen Kultivierungssuspensionen durchgeführt, bei denen untersucht werden sollte, ob die Sophoroselipidkonzentration durch die Zellabtrennung mit UES beeinflusst wird. Dabei war es vor allem von Bedeutung herauszufinden, ob die Konzentration an Sophoroselipiden in den einzelnen Teilströmen der Ultraschallseparation, also Feed, Retentat und Permeat, unterschiedlich war, ob also nicht nur die Zellen vom Ultraschall beeinflusst werden, sondern auch die Produktkristalle. Dies hätte Konsequenzen auf den Einsatz des Ultraschalltrenngerätes zur Zellabtrennung während der Sophoroselipidproduktion.

Um den Einfluss zu bestimmen, wurden Suspensionen von *C. bombicola*, die aus einer Bioreaktorkultivierung stammten, mit UES bei einer Flussrate von 2,4 l/d getrennt. Die Konzentration des Co-Substrates SBO betrug weniger als 2 g/l. Anschließend wurden sowohl die Veränderung der Biomassekonzentration als auch die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Sophoroselipidgemisches untersucht. In Tab. 11 sind diese Ergebnisse dargestellt. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die quantitative Zusammensetzung der Suspensionen bezüglich der Sophoroselipide durch die Ultraschallbehandlung nicht verändert, während die Zellkonzentration im Filtrat erwartungsgemäß reduziert werden konnte, so dass eine Trennleistung von 95 % erzielt wurde.

Tab. 11: Vergleich der Biomasse- und Sophoroselipidkonzentrationen der Teilströme einer Ultraschalltrennung von *C. bombicola*-Suspension. Der Durchsatz betrug 2,4 l/d.

	Biomasse [g/l]	SL-Konzentration [g/l]
Feed	14,1	15,2
Filtrat	0,7	14,8
Retentat	32,4	15,4

Weiterhin wurden Dünnschichtchromatogramme unterschiedlicher Proben aus den Teilströmen der Ultraschalltrennung angefertigt, um die qualitative Zusammensetzung der Sophoroselipide zu bestimmen (Abb. 34). Daraus geht hervor, dass auch diese durch die Ultraschallaufftrennung nicht beeinflusst wird.

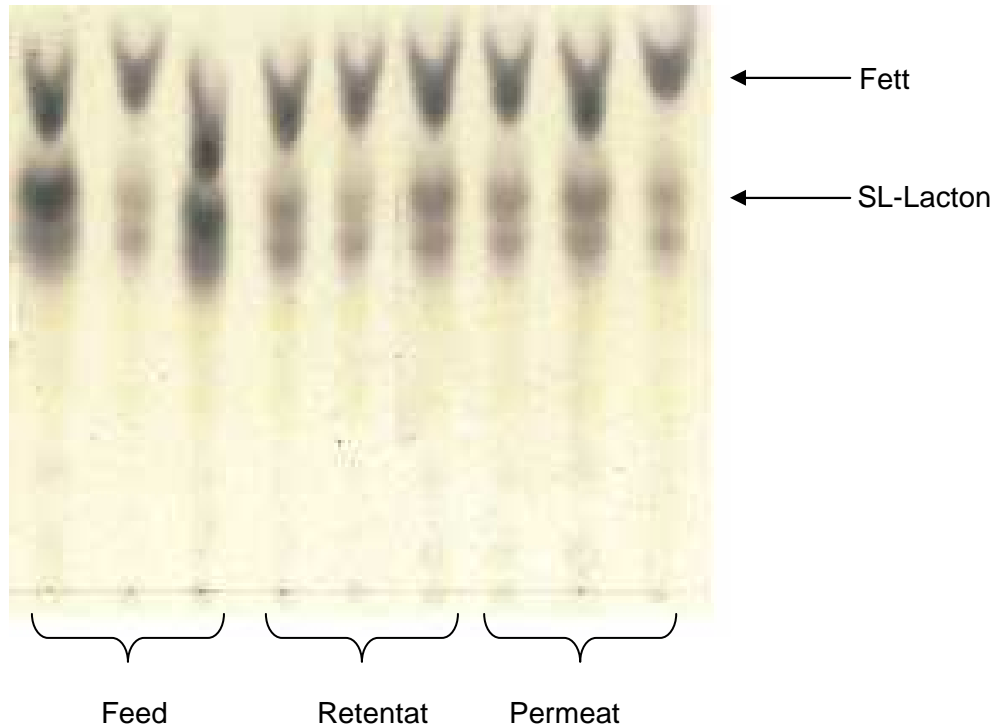


Abb. 34: Dünnschichtchromatogramm der SL aus den Teilströmen einer Ultraschalltrennung von *C. bombicola*-Suspension mit einem Durchsatz von 2,4 l/d. Bedingungen der DC: stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure.

Schließlich wurden zur Veranschaulichung mikroskopische Aufnahmen der Teilströme angefertigt. In Abb. 35 sind Feed-, Filtrat- und Retentatstrom abgebildet.

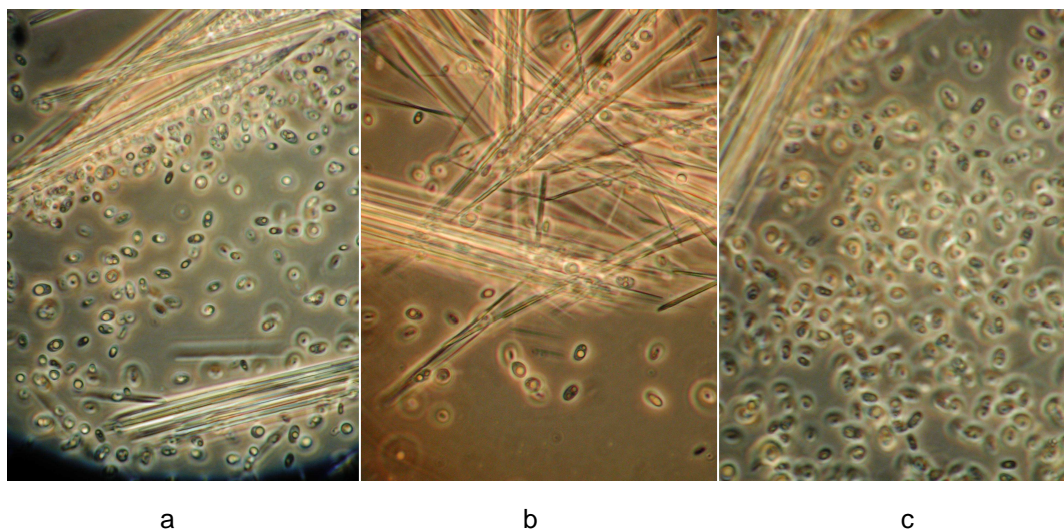


Abb. 35: Mikroskopische Aufnahme des Feed- (a), Filtrat- (b) sowie Retentat-Stromes (c) der Trennung einer *C. bombicola*-Suspension mit Sophoroselipiden durch UES bei einer Flussrate von 2,4 l/d. 400fache Vergrößerung.

Vergleicht man die Abbildungen 35 a - c miteinander, so erkennt man deutlich die Zusammensetzung der Suspension aus ovalen Hefezellen und nadelförmigen Sophoroselipidkristallen. Weiterhin erkennt man gut, dass alle Teilströme Sophoroselipide enthalten, wobei eine Quantifizierung rein optisch nicht möglich ist. Bei den Hefezellen hingegen kann man bereits vom Augenschein her deutlich erkennen, dass die Konzentration im Vergleich zum Feed im Retentat deutlich angestiegen ist, während sie beim Filtrat deutlich abgenommen hat.

3.2.2. Membranfiltration mit *Candida bombicola*

Zur Verbesserung des DSP und der prozessintegrierten Zellabtrennung wurde alternativ auch ein Membranfiltrationsverfahren untersucht. Dazu sollten zwei aufeinander folgende Filtrationsschritte durchgeführt werden, in denen selektiv zunächst die *C. bombicola*-Zellen durch Mikrofiltration zurückgehalten und anschließend die produzierten SL durch Ultrafiltration aufkonzentriert werden sollten. Die Mikrofiltration wurde mit Hohlfasermembranen einer Porengröße von 0,1 µm durchgeführt. Um zu überprüfen, ob diese Filtrationsmethode zur Verwendung mit *C. bombicola* geeignet ist, wurde eine Suspension aus einer Kultivierung mit Glucose und SBO mit einer Biomasse von 10 g/l und einer SL-Konzentration von 1,4 g/L zur Filtration verwendet. Zur Charakterisierung der Trennung wurden Zellkonzentration und SL-Konzentration von Filtrat und Permeat der Mikrofiltration zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. In Abb. 36 und Abb. 37 sind jeweils die Biomassen und SL-Konzentrationen von Retentat und Permeat zu verschiedenen Filtrationszeitpunkten dargestellt. Aus Abb. 36 ist deutlich ersichtlich, dass die *C. bombicola*-Zellen durch die Mikrofiltration im Retentat zurückgehalten werden, während das Permeat nahezu zellfrei bleibt. Umgekehrt zeigt Abb. 37, dass sich die Sophoroselipidkonzentration in den Teilströmen nicht wesentlich ändert.

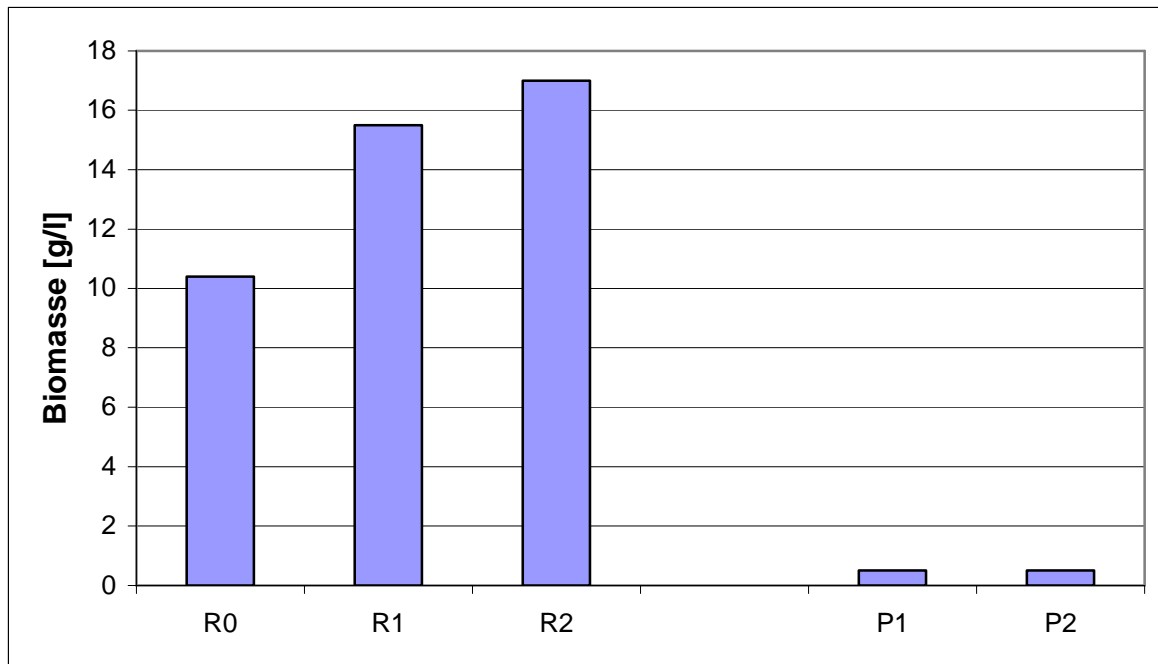


Abb. 36: Biomassen der Teilströme einer Mikrofiltration (Polysulfon-Hohlfasermembran, 0,1 μm Porengröße) von *C. bombicola*-Suspension. R = Retentat, P = Permeat. 0 = Ausgangssuspension, 1 = nach 10 min, 2 = nach 30 min.

Durch die Mikrofiltration wurde die Zellkonzentration im Retentat von 10,4 g/l auf 15,5 g/l nach 10 min und 17 g/l nach 30 min Filtrationsdauer erhöht. Die Biomassekonzentration im Permeat war mit 0,5 g/l vernachlässigbar klein. Anders verhielt es sich mit der Konzentration der Sophoroselipide: Diese blieb mit ca. 1 g/l ($\pm 0,4$ g/l) während des gesamten Prozesses der Mikrofiltration nahezu konstant.

Nach der Zellabtrennung durch Mikrofiltration erfolgte als nächster Schritt eine Ultrafiltration, um die Möglichkeit zu untersuchen, dadurch eine Aufkonzentrierung des Sophoroselipid-Produkts und somit ein vereinfachtes Downstream-Processing zu erreichen. Dazu wurde eine Polysulfon-Hohlfasermembran mit einem molekularen Cut-Off von 5 kD verwendet. Abb. 38 zeigt das Ergebnis der Ultrafiltration im Vergleich der Sophoroselipidkonzentrationen von Filtrat und Permeat. Durch die Ultrafiltration wurde die Sophoroselipidkonzentration im Retentat von 10,2 g/l auf 16 g/l erhöht, während sie im Permeat nur 3 bzw. 2,5 g/l betrug. Damit ist erkennbar, dass die Ultrafiltration eine erhöhte Konzentration von Sophoroselipid im Retentat bewirkt, während das Filtrationspermeat nur noch ca. 25 % der ursprünglichen SL-Konzentration enthält. Dabei konnte durch DC gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Sophoroselipid-Gemisches durch den Filtrationsprozess nicht beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt).

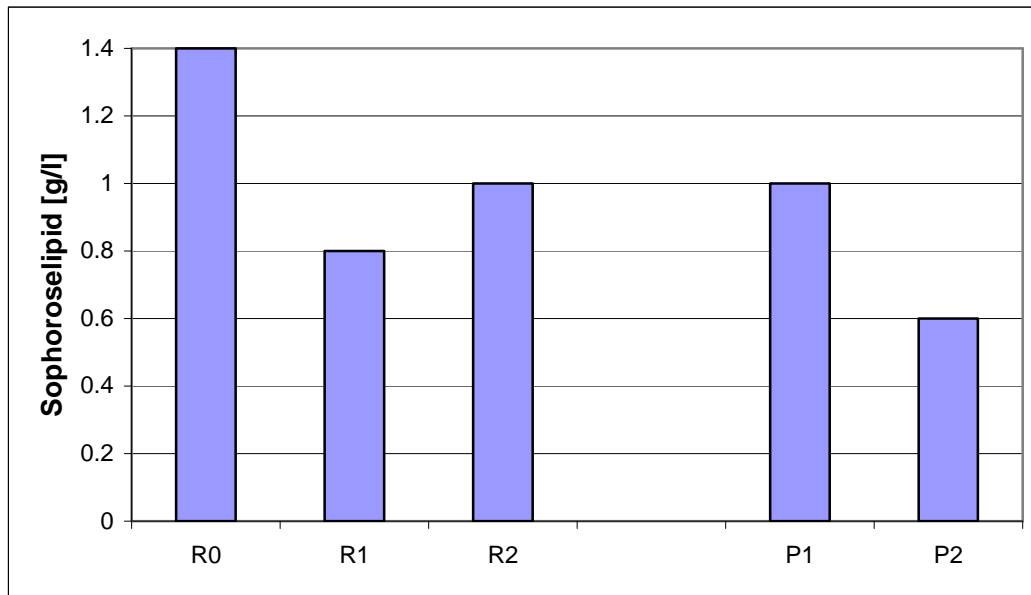


Abb. 37: SL-Konzentrationen der Teilströme einer Mikrofiltration (Polysulfon-Hohlfasermembran, 0,1 μm Porengröße) von *C. bombicola*-Suspension. R = Retentat, P = Permeat. 0 = Ausgangssuspension, 1 = nach 10 min, 2 = nach 30 min.

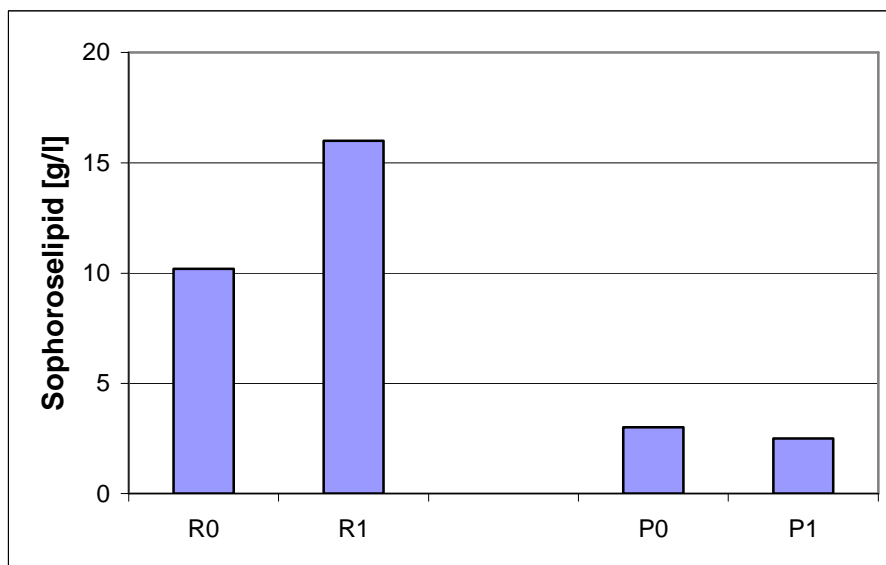


Abb. 38: SL-Konzentrationen der Teilströme einer Ultrafiltration (Polysulfon-Hohlfasermembran, 5 kD Cut-Off) von *C. bombicola*-Suspension. R = Retentat, P = Permeat. 0 = Ausgangssuspension, 1 = nach 10 Minuten.

Mit der Membranfiltrationsmethode konnten Trennleistungen von ca. 99,95 % für *C. bombicola*-Zellen durch Mikrofiltration sowie von 75,9 % für Sophoroselipide durch Ultrafiltration erzielt werden. Die für *C. bombicola*-Zellen gezeigten Trennleistungen sind höher als die durch UES erzielten (98,9 %). Da es sich bei der Zelltrennung durch Ultraschall jedoch um ein besonders zellschonendes Verfahren handelt, sollte dies primär auf seine Eignung zur Prozessintegration untersucht werden. Ein weiterer Grund für die bevorzugte Prozessintegration des UES war dessen relativ einfache

technische Handhabung und der geringere apparative Aufwand, insbesondere im Hinblick auf die benötigten Pumpen.

3.3. Bioreaktorkultivierungen zur Gewinnung von Sophoroselipiden inkl. Tests der Ultraschall-Separationstechnik

Im Folgenden sind Versuche im Bioreaktormaßstab beschrieben, bei denen die im Schüttelkolbenversuch gefundenen günstigsten Substratkombinationen genutzt werden sollten, um möglichst hohe Ausbeuten an Sophoroselipid zu erzielen. Die besten gefundenen Substratkombinationen waren diejenigen mit Glucose bzw. Saccharose und SBO. Zur Produktionsoptimierung sollten unterschiedliche Substratkonzentrationen und verschiedene Fütterungsstrategien untersucht werden, um schließlich die Ultraschallzelltrennung in den Produktionsprozess zu integrieren. Diese sollte auf ihre Eignung hin untersucht werden, die Produkttrennung zu erleichtern und dadurch die Ausbeute des Prozesses zu erhöhen. Deshalb sollte in Vorversuchen die Fütterungsstrategie und Prozessführung optimiert werden.

Generell ist anzumerken, dass die Versuche nur bis zum Erreichen des ersten pO_2 -Minimums (nach ca. 12 - 24 h) unter streng aseptischen Bedingungen durchgeführt wurden. Danach wurde das hydrophile Substrat (Glucose bzw. Saccharose) in kristalliner Form ohne vorherige Sterilisation zugegeben. Außerdem konnten die durchgeführten Separationsversuche aus technischen Gründen nicht unter aseptischen Bedingungen durchgeführt werden.

3.3.1. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, ohne Glucose-Nachfütterung

In der Literatur war gezeigt worden (u. a. Rau et al. 2001), dass es zur Produktion großer Mengen Sophoroselipide mit *Candida bombicola* zweckmäßig ist, sowohl Zucker als hydrophile C-Quelle als auch die hydrophobe C-Quelle nicht zu Beginn der Kultivierung vollständig und somit in hoher Konzentration vorzulegen, sondern im Laufe des Prozesses nachzufüttern. Um jedoch eine Datenbasis zu erhalten, wurde zunächst eine Kultivierung ohne Glucosezufütterung durchgeführt, bei der aber das hydrophobe Substrat SBO in Portionen zudosiert wurde. Dabei wurde ein 10 l-Bioreaktor mit einem Füllvolumen von 9 l verwendet. Die vorgelegte Glucosemenge

betrug 100 g/l, die sonstigen Medienbestandteile sind Kap. 2.3.2 zu entnehmen. Das Co-Substrat SBO wurde ab 2 h Kultivierungsdauer und danach fortlaufend eine Menge von 1 g/h bzw. 0,11 g/(l·h) zugegeben. Um die steigenden Substratverbrauchsrate der wachsenden Hefen zu erfüllen, wurde die Zugaberate während der Kultivierung erhöht. Da das verwendete SBO neben seiner Funktion als Co-Substrat auch als Antischaummittel dienen sollte, konnte die Zudosierung auch im Bedarfsfall kurzfristig erhöht werden. Die exakten Zeitpunkte und Mengen der Zudosierung sind in Abb. 39 nicht explizit wiedergegeben, sondern es wurde die Gesamtmenge des verbrauchten SBO aufgezeichnet, die zur abschließenden Bilanzierung dient.

Die bei dieser Kultivierung beobachteten Parameter sind in Abb. 39, 40 und 41 dargestellt. Abb. 39 und 40 zeigen zunächst die aktuellen Konzentrationen gelöster bzw. suspendierter Stoffe (BTM, Glucose, SL, SBO, pH-Wert sowie pO_2), Abb. 41 gibt Daten aus der Abgasanalyse wieder.

Die Bildung der Biomasse erfolgt hauptsächlich in den ersten 48 h nach Beginn der Kultivierung. Daneben ist in Abb. 39 die stetige und zunächst annähernd lineare Abnahme des hydrophilen Substrats Glucose über den Kultivierungsverlauf erkennbar. Nach ca. 96 h ist eine Glucosekonzentration von ca. 6 g/l erreicht, die dann langsam weiter abnimmt und schließlich nach 144 h einen Wert von 0,1 g/l erreicht; also wird das Substrat Glucose nahezu vollständig verbraucht.

Die Produktbildung beginnt nach ca. 12 h, die Kurve steigt anschließend bis 96 h an, um dann in eine flachere Steigung überzugehen. Damit scheint die Produktbildung nachzulassen zu dem Zeitpunkt, an dem die Glucose im Wesentlichen verbraucht ist. Größere aktuelle Konzentrationen des Co-Substrats SBO in der Kultivierungssuspension sind im Verlauf der gesamten Kultivierung nicht zu beobachten. Das ist ein Zeichen dafür, dass das gesamte zugegebene Co-Substrat in die Zellen eingelagert oder zu Produkt umgewandelt wird.

Betrachtet man den Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes, so erkennt man, dass dieser nach 12 h ein Minimum erreicht (Abb. 40). Sowohl pH-Wert als auch pO_2 wurden geregelt, der pH-Wert durch Zudosierung von NaOH auf einen Wert um 3,5, der pO_2 durch Änderung der Drehzahl auf bis zu 600/min auf einen Wert von über 30 %. Wie man in Abb. 40 erkennt, funktioniert die Regelung im Rahmen gewisser Schwankungen sehr gut. Diese Werte werden deshalb nur einmal dargestellt und für weitere Kultivierungen nicht mehr.

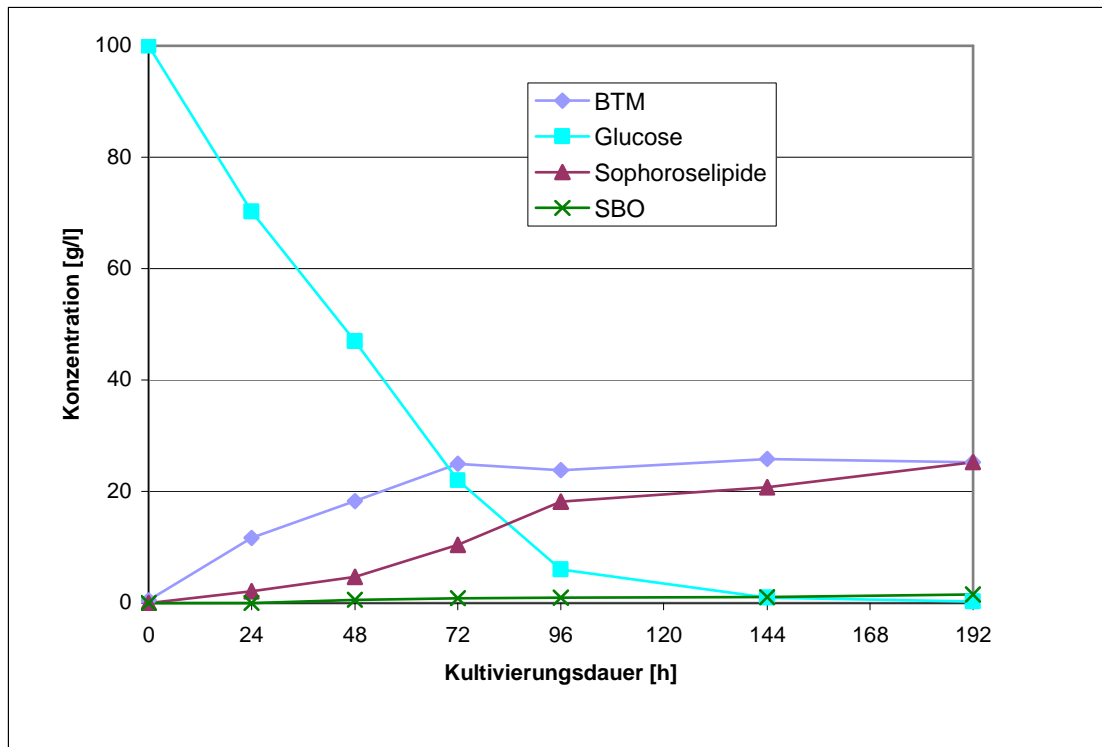


Abb. 39: Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 42,6 g/l.

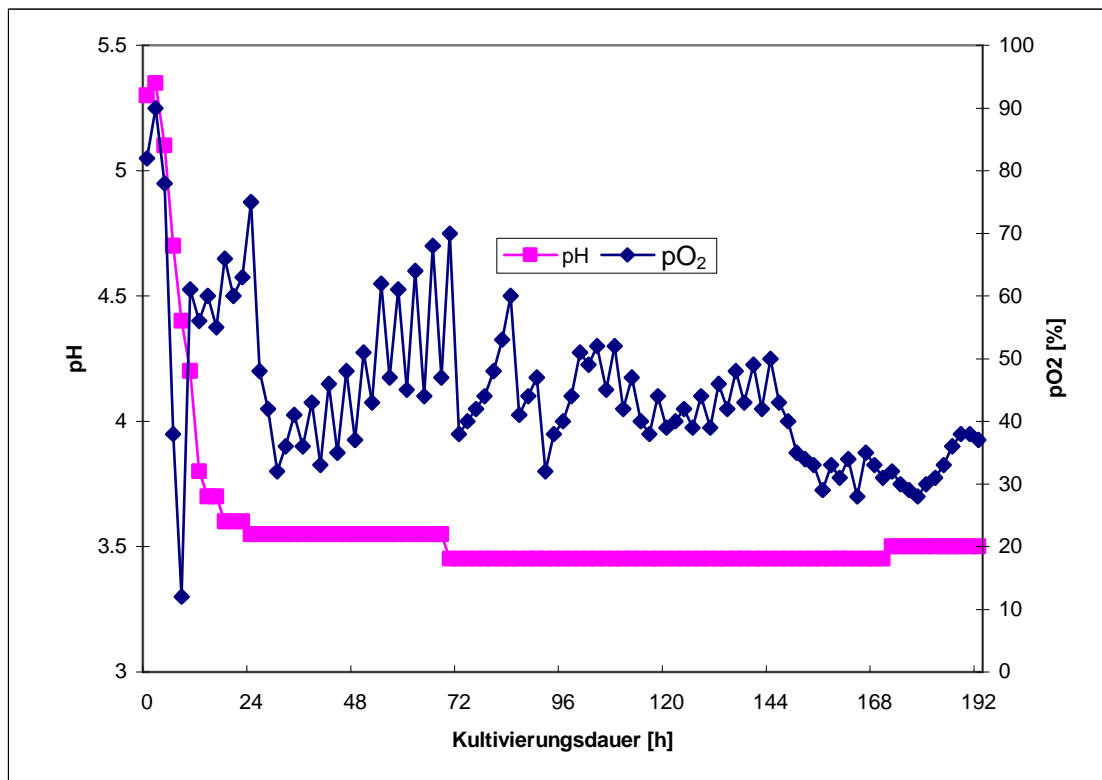


Abb. 40: Verlauf der Parameter pH und pO₂ einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 42,6 g/l.

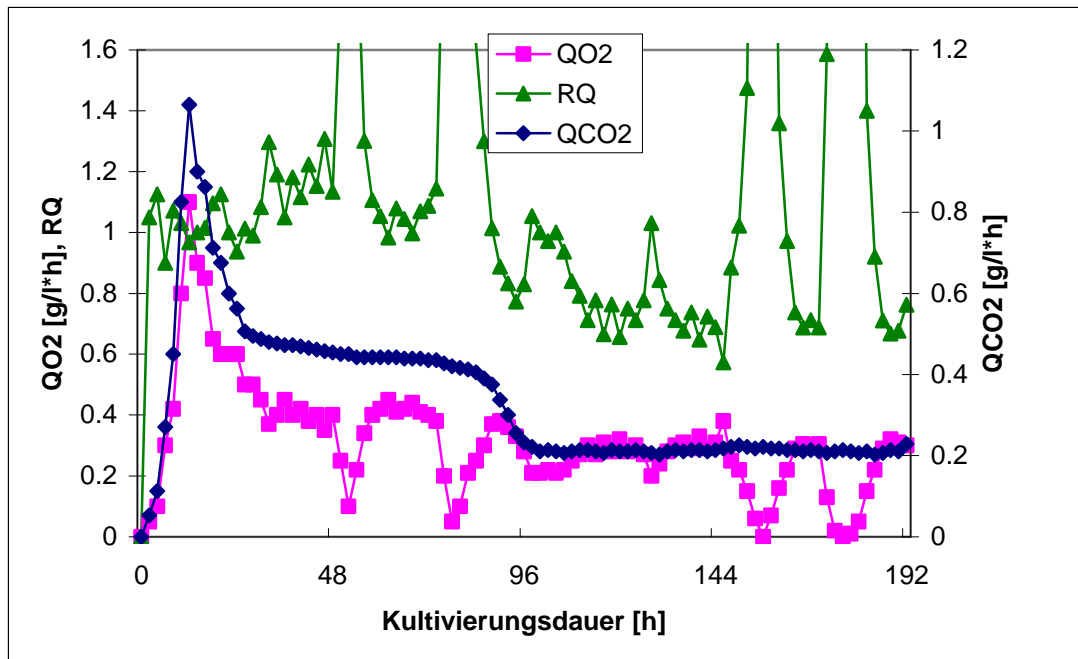


Abb. 41: Verlauf der Parameter Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} , Kohlendioxidbildungsrate Q_{CO_2} und Respirationskoeffizient RQ einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 42,6 g/l.

Aus dem Verlauf von Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} und Kohlendioxidbildungsrate Q_{CO_2} in Abb. 41 kann man gut das Ende des exponentiellen Wachstums nach ca. 12 h erkennen. Zu diesem Zeitpunkt weisen beide Raten ein Maximum auf. Ansonsten erkennt man gut, dass der Prozess aerob verläuft, der RQ liegt zwischen 0,7 und 1.

Abschließend werden in Tab. 12 die Ergebnisse der Kultivierung noch einmal zusammengefasst.

Tab. 12: Wachstums- und Produktbildungsparameter der Produktion von Sophoroselipiden mit *C. bombicola* ohne Glucose-Zufütterung nach 192 h.

Glucosezugabe gesamt [g/l]	100
Glucoseverbrauch [g/l]	99,9
SBO-Zugabe gesamt [g/l]	42,6
SBO-Verbrauch [g/l]	41,1
Biomasse (BTM) [g/l]	25,1
Sophoroselipide [g/l]	25,3
P_V [g/(l·d)]	3,2
$Y_{SL/X}$ [g/g]	1,01
$Y_{SL/(Gluc + SBO)}$ [g/g]	0,18

3.3.2. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, zusätzlich mit Glucose-Nachfütterung

Da aus der Literatur (Rau et al. 2001, Guilmanov et al. 2002) bekannt ist, dass hohe Produktausbeuten bei der Herstellung von Sophoroselipiden mit *C. bombicola* zu erzielen sind, wenn das Kohlenhydrat-Substrat nicht auf einmal vorgelegt wird, sondern im Laufe des Prozesses nachdosiert wird, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Optimierung der Zufütterung durchgeführt werden. Dazu wurden verschiedene Fütterungsraten von 10 g/(l·d), 30 g/(l·d) und 50 g/(l·d) untersucht. Zu den einzelnen Fütterungsraten wurden jeweils drei Kultivierungen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu untersuchen. Die Glucose-Zufütterung wurde jeweils nach 24 h begonnen und dann wurde täglich jeweils eine Portion zugegeben. Ausnahmen von dieser Strategie sind im jeweiligen Kapitel beschrieben.

3.3.2.1. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, mit 10 g/(l·d) Glucose-Nachfütterung

Zunächst sollten die Auswirkungen einer eher geringen Glucose-Zufütterungsrate von 10 g/(l·d) untersucht werden. Die übrigen Parameter wurden so gewählt wie unter 3.3.1 beschrieben. Insgesamt wurden drei Kultivierungen unter diesen Bedingungen durchgeführt. Abb. 42 zeigt die Kultivierungsparameter einer der Kultivierungen mit einer Glucose-Zufütterungsrate von 10 g/(l·d). Im Verlauf der Kultivierung konnte eine Sophoroselipidkonzentration von 46 g/l nach 144 h erreicht werden. Auffällig ist, dass trotz Glucosezufütterung die Konzentration an Glucose über den gesamten Verlauf der Kultivierung nahezu bei 0 lag. Untypisch ist der Verlauf der Biomassekonzentration, die bis auf > 60 g/l anstieg. Auch in Versuch 3 wurden hohe Biomassekonzentrationen von zwischenzeitlich > 100 g/l erzielt. Dies ist auf generelle Mess- und Probenahme-Ungenauigkeiten zurückzuführen, die in Kap. 4.3.2 näher erläutert werden sollen.

Tab. 13 zeigt die Wachstums- und Produktbildungsparameter der einzelnen Kultivierungen. Da einer der variablen Parameter der Kultivierung die Zugabe an dem Co-Substrat SBO war, sollten bei den Versuchen mit identischer Glucose-Zufütterungsrate unterschiedlich große Mengen an SBO zugegeben werden, um den Effekt der Co-Substrat-Menge untersuchen zu können. Dazu muss festgestellt

werden, dass die Co-Substratzugabe nicht beliebig variiert werden konnte, da SBO auch als Antischaummittel diente, so dass während einer Kultivierung die Notwendigkeit der Zugabe auftreten konnte. Dadurch war es unmöglich, eine konstante oder eine nach einem mathematischen Zusammenhang mit der Kultivierungsdauer zu errechnende Zugaberate zu wählen. Dennoch konnte die Zugabemenge in einem gewissen Rahmen variiert werden.

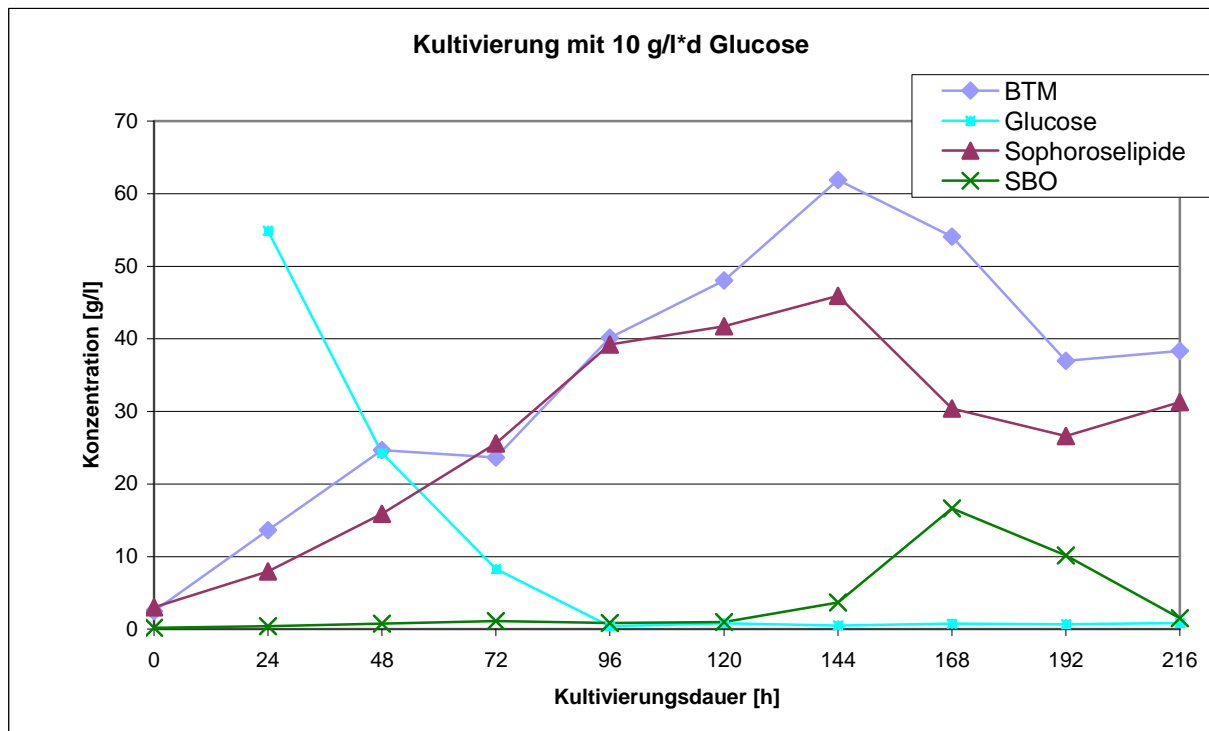


Abb. 42: Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit Glucose (10 g/(l·d))- und SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebener Glucose: 180 g/l, Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 55,4 g/l. [Kultivierung Nr.1/Tab. 13]

Da zum Ende der 1. Kultivierung nur noch wenig SBO vorlag, sollte untersucht werden, ob eine größere Menge SBO als die zugegebenen 55,4 g/l die erzielbare Menge an Sophoroselipiden steigern könnte. Deshalb wurden in Versuch 2 85,4 g/l SBO zugegeben. Danach lag allerdings eine relativ große Menge an Co-Substrat unverbraucht vor (31,5 g/l, s. Tab. 13). Deshalb wurde für Versuch 3 eine geringere Menge SBO (40,1 g/l) verwendet, von der 38,5 g/l verbraucht wurden. Dabei wurden allerdings nur 28 g/l Sophoroselipide gebildet im Gegensatz zu 70 g/l in Versuch 2.

Tab. 13: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter der Kultivierungen mit *C. bombicola* mit 10 g/(l·d) Glucose-Zufütterung, bestimmt zum Ende der Kultivierungen. Die Ergebnisse der in Abb. 42 dargestellten Kultivierung sind gelb hinterlegt, die Mengen an verbrauchtem Substrat grau.

Kultivierung Parameter	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3
Glucosezugabe gesamt [g/l]	180	180	180
Glucoseverbrauch [g/l]	179	146	180
SBO-Zugabe gesamt [g/l]	55,4	85,4	40,1
SBO-Verbrauch [g/l]	49,8	53,9	38,5
Biomasse (BTM) [g/l]	38	71	31
Sophoroselipide [g/l]	31	70	28
P_V [g/(l·d)]	3,9	8,8	3,5
$Y_{SL/X}$ [g/g]	0,82	0,99	0,90
$Y_{SL/(Gluc + SBO)}$ [g/g]	0,14	0,35	0,13

Da neben der Steigerung der Produktbildung das Hauptziel der Kultivierungen war, gute Bedingungen für eine Zellabtrennung durch Ultraschall zu finden, war der möglichst vollständige Verbrauch des Co-Substrates anzustreben. Es sollten also ausreichend große Mengen SBO verwendet werden, um eine gute Produktbildung zu ermöglichen, aber so geringe Mengen, dass sich das SBO nicht in größeren Mengen in der Suspension akkumuliert. Unter diesen Voraussetzungen wurden die Parametereinstellungen für die Kultivierungen mit einer Glucose-Zufütterungsrate von 30 g/(l·d) gewählt.

3.3.2.2. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, mit 30 g/(l·d) Glucose-Nachfütterung

Im nächsten Schritt wurde die Glucose-Zufütterungsrate auf 30 g/(l·d) erhöht. Um die Menge an restlichem Co-Substrat möglichst gering zu halten, wurde im Verlauf der ersten Kultivierung eine eher geringe Menge von 22,5 g/l SBO zugegeben. Da mit 20,5 g/l nur relativ wenig Produkt gebildet wurde und das Co-Substrat fast vollständig verbraucht worden war, wurde die Menge an zugegebenem SBO in Kultivierung 2 mit 46,6 g/l auf ungefähr das Doppelte erhöht. In Abb. 43 sind die Ergebnisse aus Kultivierung 2 dargestellt. Von den 46,6 g/l an zugegebenem SBO wurden 45,4 g/l

verbraucht, 1,2 g/l blieben übrig. Da die mit diesen Parametern erzielte Produktbildung ausreichend und die restliche Co-Substratmenge gering war, wurden ähnliche Mengen an SBO für die nachfolgenden Kultivierungen mit 50 g/(l·d) Glucosezufütterung verwendet. Abschließend sind die Ergebnisse der Versuche mit 30 g/(l·d) Glucosezufütterung in Tab. 14 zusammengefasst.

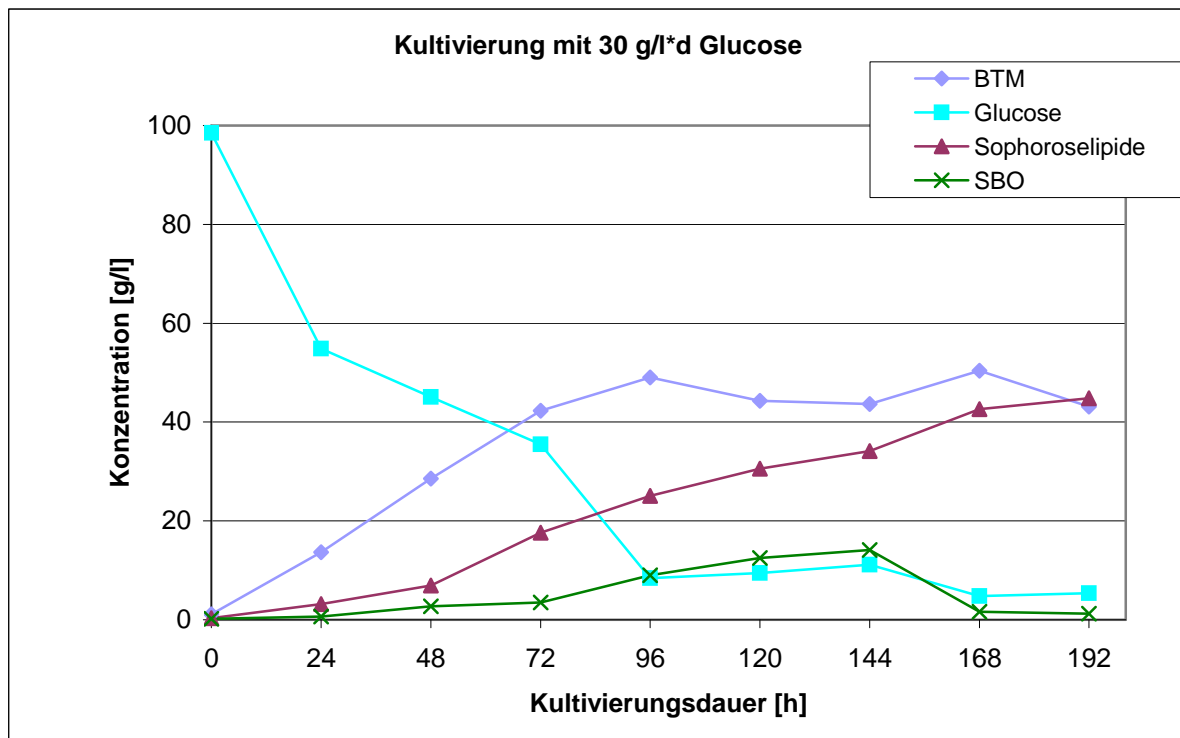


Abb. 43: Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit Glucose (30 g/(l·d))- und SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebener Glucose: 310 g/l, Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 46,6 g/l. [Kultivierung Nr. 2/Tab.14]

Tab. 14: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter der Kultivierungen mit *C. bombicola* mit 30 g/(l·d) Glucose-Zufütterung, bestimmt zum Ende der Kultivierungen nach 192 h. Die Ergebnisse der in Abb. 43 dargestellten Kultivierung sind gelb hinterlegt, die Mengen an verbrauchtem Substrat grau.

Kultivierung Parameter	Nr. 1	Nr. 2
Glucosezugabe gesamt [g/l]	310	310
Glucoseverbrauch [g/l]	173	305
SBO-Zugabe gesamt [g/l]	22,5	46,6
SBO-Verbrauch [g/l]	21,1	45,4
Biomasse (BTM) [g/l]	59,1	43,1
Sophoroselipide [g/l]	20,5	44,8
P_V [g/(l·d)]	2,6	5,6
$Y_{SL/X}$ [g/g]	0,35	1,04
$Y_{SL/(Gluc + SBO)}$ [g/g]	0,13	0,12

3.3.2.3. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, mit 50 g/(l·d) Glucose-Nachfütterung

Abschließend sollte der Einfluss einer großen Glucose-Zufütterungsmenge von 50 g/(l·d) untersucht werden. Dabei wurde zunächst eine Co-Substrat-Menge von 47,2 g/l verwendet, die in etwa der Menge entspricht, die in den Versuchen mit einer Zugabemenge von 30 g/(l·d) (Kap. 3.3.2.2) eingesetzt worden war. Abb. 44 zeigt die Ergebnisse dieser Kultivierung, in der mit 110,8 g/l eine große Menge Produkt gebildet werden konnte. Um aber die Menge an frei vorliegendem Co-Substrat möglichst gering zu halten, wurde in Kultivierung 2 eine eher geringe Menge SBO von 29,3 g/l zugegeben. Dies war nötig, da später die Zelltrennung durch Ultraschall in den Produktionsprozess integriert werden sollte, was zur Durchführbarkeit eine möglichst geringe Konzentration an Co-Substrat voraussetzt (s. Kap. 3.2.1.3.3). Durch die geringe SBO-Zugabemenge in Kultivierung 2 konnte die Konzentration an freiem SBO über den gesamten Verlauf der Kultivierung niedrig gehalten werden, so dass zum Ende nur noch 2,6 g/l übrig waren. Leider konnten durch die geringe Menge an zugegebenem Co-Substrat im Vergleich zu Kultivierung 1 nur relativ geringe Mengen an Sophoroselipid von 60 g/l gebildet werden.

Um eine möglichst große Menge an Sophoroselipiden zu bilden und gleichzeitig die Co-Substrat-Konzentration möglichst niedrig zu halten, wurde in Kultivierung 3 für die Menge an verwendetem SBO ein Wert gewählt, der mit 39,9 g/l zwischen denen von Kultivierung 1 und 2 lag. Die Ergebnisse von Kultivierung 3 werden getrennt in Kap. 3.3.3.2 beschrieben.

Tab. 15 fasst die Wachstums- und Produktbildungsdaten von Kultivierungen 1 und 2 noch einmal zusammen.

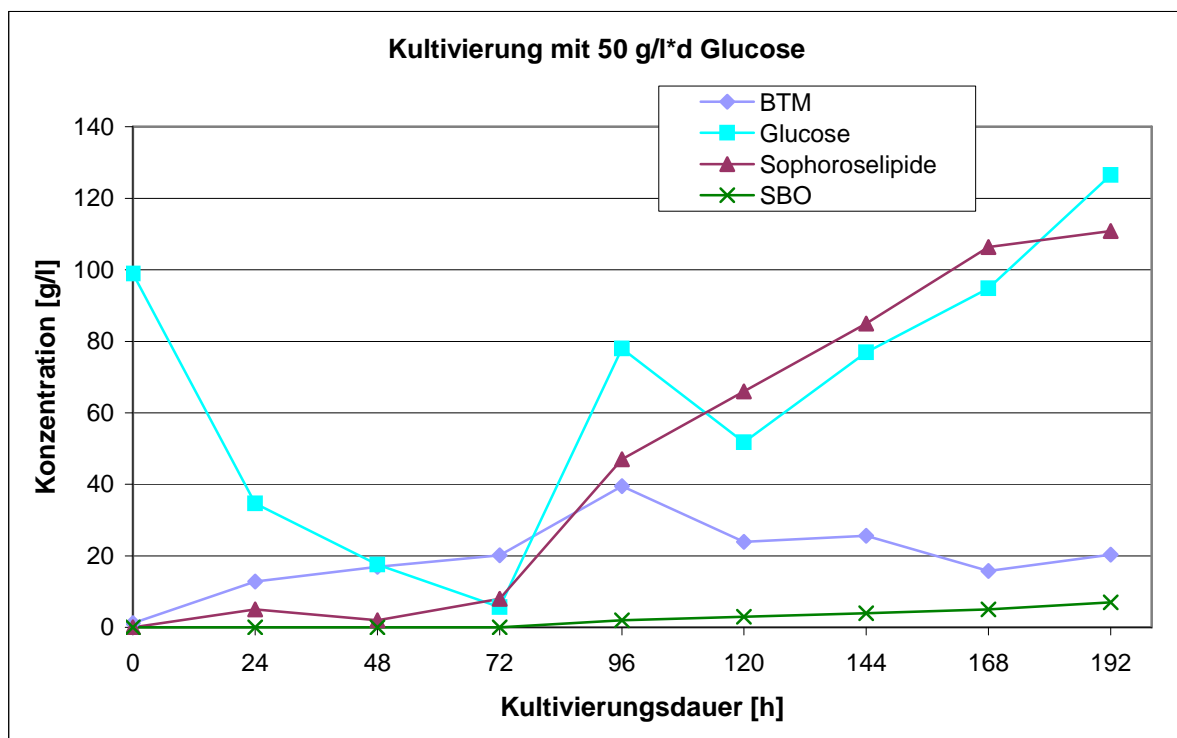


Abb. 44: Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit Glucose (50 g/(l·d))- und SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebener Glucose: 450 g/l, Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 47,2 g/l. [Kultivierung Nr.1/Tab.15]

Tab. 15: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter der Kultivierungen mit *C. bombicola* mit 50 g/(l·d) Glucose-Zufütterung, bestimmt zum Ende der Kultivierungen nach 192 h. Die Ergebnisse der in Abb. 44 dargestellten Kultivierung sind gelb hinterlegt, die Mengen an verbrauchtem Substrat grau.

Kultivierung Parameter	Nr. 1	Nr. 2
Glucosezugabe gesamt [g/l]	450	450
Glucoseverbrauch [g/l]	374	306
SBO-Zugabe gesamt [g/l]	47,2	29,3
SBO-Verbrauch [g/l]	40,2	26,7
Biomasse (BTM) [g/l]	20,4	19,4
Sophoroselipide [g/l]	111	60,0
P_V [g/(l·d)]	13,8	7,5
$Y_{SL/X}$ [g/g]	5,43	3,10
$Y_{SL/(Gluc + SBO)}$ [g/g]	0,27	0,18

3.3.2.4. Vergleich der Bioreaktorkultivierungen mit Glucose-Nachfütterung

Das Ziel der Bioreaktorkultivierungsversuche war es gewesen, Bedingungen zu finden, unter denen eine Zellabtrennung durch Ultraschall gut durchgeführt werden konnte. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass dazu niedrige Konzentrationen an hydrophoben Co-Substraten nötig sind, so dass diese Bedingung auch bei den Bioreaktorkultivierungen erfüllt sein sollte. Allerdings sollten auch hohe Sophoroselipidkonzentrationen erzielt werden, um möglichst realistische Bedingungen für die Ultraschalltrennung darzustellen. Denn schließlich soll die Ultraschalltrennung in den Produktionsprozess integriert werden, um die Zellabtrennung zu erleichtern und so eine erfolgreichere Sophoroselipidproduktion zu ermöglichen.

Vergleicht man Tab. 11 bis 15 miteinander, so erkennt man, dass bei der höchsten eingesetzten SBO-Menge (Kultivierung 2, Glucose-Zugabe 10 g/(l·d), Tab. 13) von 85,4 g/l über 30 g/l übrig geblieben waren, so dass diese Menge ungeeignet ist und eine geringere SBO-Menge eingesetzt werden muss. Auch bei der nächst kleineren SBO-Menge (Kultivierung 1, Glucose-Zugabe 10 g/(l·d), Tab. 13) von 55,4 g/l wird

das Co-Substrat nicht vollständig verbraucht, allerdings ist die Restmenge mit 5,6 g/l deutlich geringer. Erst bei geringeren SBO-Zugabemengen von < 50 g/l wird das eingesetzte SBO nahezu vollständig verbraucht. Eine Ausnahme stellt Kultivierung 1 bei einer Glucose-Zugabe von 50 g/(l·d) (Tab. 15) dar. Hier bleiben von 47,2 g/l eingesetztem SBO 7 g/l übrig. Aus diesem Grund sollten für die weiteren Kultivierungen relativ niedrige Mengen an SBO von ca. 25 g/l verwendet werden.

Weiterhin ist auch auffällig, dass die Menge an gebildetem Sophoroselipid mit steigender Menge der zugegebenen Glucose ansteigt. So konnten schließlich bei einer Glucose-Zugabe von 50 g/(l·d) (Kultivierung 1, Tab. 15) über 110 g/l Sophoroselipide produziert werden. Deshalb sollten in einem weiteren Versuch zur Integration der Ultraschalltrennung in den Produktionsprozess diese hohen Zugabemengen an Glucose von 50 g/(l·d) verwendet werden. Um die grundsätzliche Anwendbarkeit des UES in einem Verfahren zur Herstellung von Sophoroselipiden mit *C. bombicola* zu untersuchen, wurde dieses jedoch zunächst bei einer Kultivierung ohne Glucose-Zufütterung angewandt, wie im Folgenden beschrieben (Kap. 3.3.3.1).

3.3.3. Bioreaktorkultivierung mit integrierter Ultraschall-Zellabtrennung

Um die Möglichkeit zu untersuchen, die Herstellung von Sophoroselipiden durch prozessintegrierte Zellabtrennung zu erleichtern, sollte schließlich das Ultraschalltrennverfahren des UES in den Prozess integriert werden. Dazu wurden zwei Kultivierungen mit unterschiedlichen Zufütterungsstrategien durchgeführt: Im ersten Prozess wurde ohne Glucose-Zufütterung gearbeitet (wie in Kap. 3.3.1), im zweiten mit 50 g/(l·d), da sich diese Zugabemenge als am besten geeignet zur Herstellung großer Mengen an Sophoroselipiden gezeigt hatte (Kap. 3.3.2).

3.3.3.1. Bioreaktorkultivierung ohne Glucose-Zufütterung, mit integrierter Ultraschall-Zellabtrennung

Um zu zeigen, dass UES in einem Verfahren zur Herstellung von Sophoroselipiden mit *C. bombicola* grundsätzlich anwendbar ist, wurde UES zunächst bei einer Kultivierung ohne Glucose-Zufütterung eingesetzt. Dazu wurde dem Reaktor Medium entnommen, das mit einer Schlauchpumpe als Feed-Strom durch ein 10 l/d-

Ultraschall-Trenngerät gefördert wurde. Mit einer weiteren Schlauchpumpe wurde der Permeat-Strom reguliert, während der Retentat-Strom durch die Differenzströme festgelegt und direkt zurück in den Reaktor geleitet wurde. Das zellfreie Permeat mit Sophoroselipiden wurde in ein Ruhegefäß geleitet, wo sich die Sophoroselipide absetzen sollten. Der dann erhaltene produktfreie Überstand wurde durch eine weitere Pumpe wieder zurück in den Reaktor überführt. So sollte dem Prozess kontinuierlich Produkt entzogen werden, das durch vorherige Zellabtrennung sehr viel einfacher aufzureinigen wäre. Eine Übersicht des Prozesses ist in Abb. 45 dargestellt.

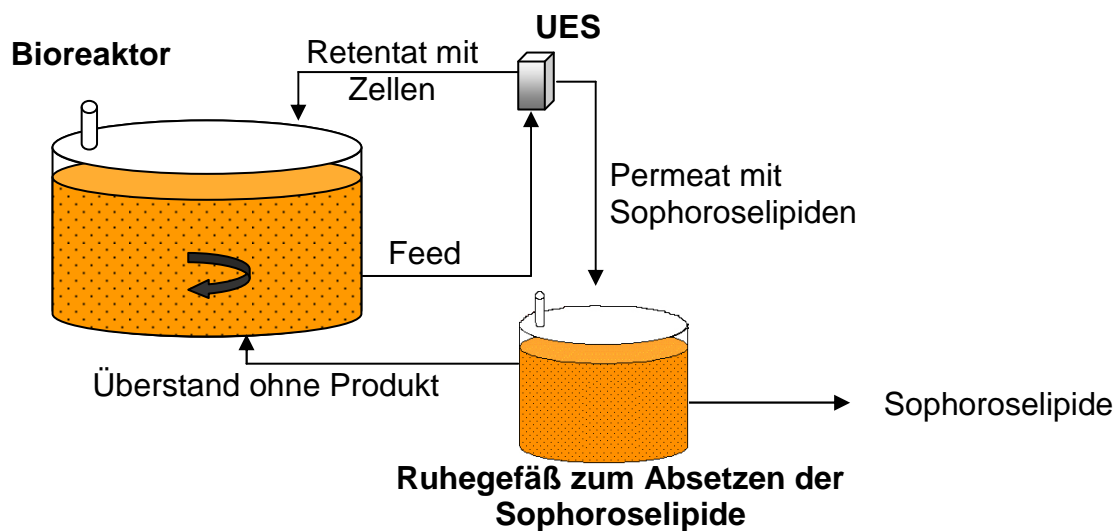


Abb. 45: Übersicht der Anordnung einer UES-Anlage zur prozessintegrierten Abtrennung von Zellen bei der Herstellung von Sophoroselipiden mit *C. bombicola*.

Das Co-Substrat SBO wurde mit einer Menge von 24,7 g/l zugegeben. Abb. 46 zeigt während der Kultivierung durch Probenahme aus dem Bioreaktor ermittelte Prozessparameter.

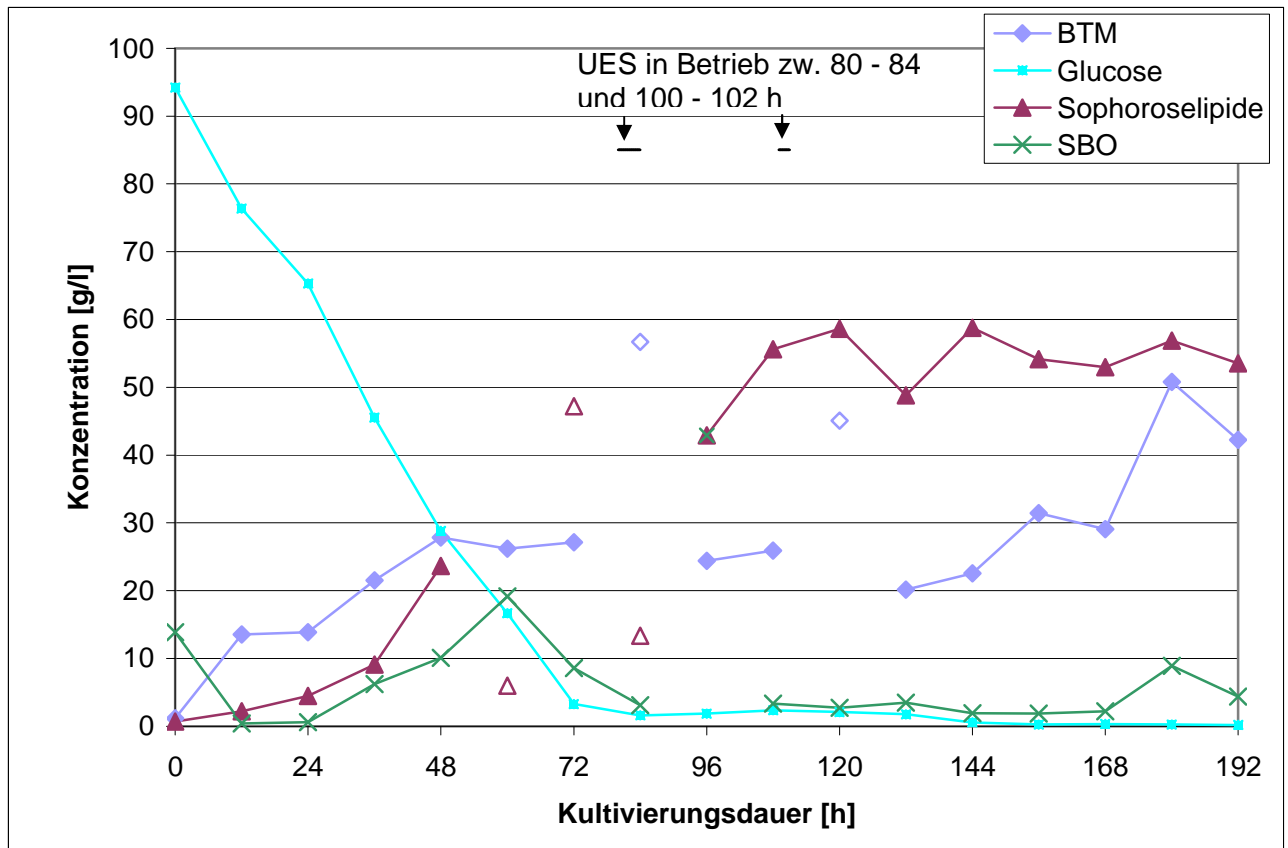


Abb. 46: Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 24,7 g/l. UES wurde nach 80 h für 4 h und nach 100 h für 2 h verwendet, Details s. Text. Messwerte, die zu weit außerhalb des möglichen Bereiches sind, sind nicht verbunden und ohne Ausfüllung dargestellt.

Die Messungen der Parameter Biotrockenmasse, SBO und Sophoroselipid unterliegen relativ großen Schwankungen. Dies lässt sich einerseits durch die komplexe Kultivierungssuspension erklären, andererseits dürfte auch die parallel durchgeführte Zelltrennung einen Einfluss auf die Parametermessungen haben. Dennoch lassen sich für alle genannten Parameter zumindest Tendenzen erkennen und durch die Ermittlung der Endwerte gute Bilanzaussagen treffen. Die Messwerte, die am wenigsten plausibel sind, sind zur Verdeutlichung in der graphischen Darstellung in Abb. 46 nicht mit den anderen Messwerten verbunden und ihre Symbole sind nicht ausgefüllt worden.

Die Produktkurve zeigt starke Schwankungen im Bereich zwischen 60 und ca. 100 h. Danach aber erreicht die Konzentration annähernd konstante Werte um die 55 g/l, die sich bis zum Ende der Kultivierung nicht wesentlich ändern. Die Konzentrationen an frei vorliegendem Co-Substrat sind mit ca. 4 g/l ab 108 h Kultivierungsdauer relativ gering und ausreichend niedrig, um eine Ultraschalltrennung problemlos durchzuführen.

Nach 80 h Kultivierungsdauer wurde die Anlage zur Zellabtrennung in Betrieb genommen. Dieser relativ späte Zeitpunkt wurde gewählt um sicherzustellen, dass das Zellwachstum zum Beginn der Abtrennung bereits abgeschlossen war. Außerdem sollte die Trennung bei möglichst niedrigen Substrat-Konzentrationen, besonders von SBO, durchgeführt werden, um Probleme durch die hohe Viskosität der Fermentationssuspension zu vermeiden. Dennoch musste die Abtrennung nach 4 h Betrieb wieder unterbrochen werden, da die Retentatsuspension, in der die Zellen stark angereichert vorlagen, so dass die Viskosität zusätzlich erhöht war, das Trenngerät verstopft hatte. Nach ca. 110 h wurde die Abtrennung erneut für zwei Stunden durchgeführt, musste aber aus denselben Gründen abgebrochen werden. Tab. 16 gibt eine Übersicht über die insgesamt ermittelten Produktionsparameter.

Tab. 16: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter einer Kultivierung mit *C. bombicola* ohne Glucose-Zufütterung mit integrierter Ultraschallabtrennung, bestimmt zum Ende der Kultivierung nach 192 h.

Glucosezugabe gesamt	100 g/l
Glucoseverbrauch	99,9 g/l
SBO-Zugabe gesamt	24,7 g/l
SBO-Verbrauch	20,3 g/l
Biomasse (BTM)	42,3 g/l
Sophoroselipide - Bioreaktor - Absetzgefäß	53,5 g/l + 0,5 g/l
P_V	6,7 g/(l·d)
$Y_{SL/X}$	1,27
$Y_{SL/(Gluc + SBO)}$	0,45

Aus den Parametern, die während der Betriebszeit bestimmt werden konnten, wurde für den Trenngrad des UES-Prozesses ein Wert von 96 % bezogen auf die BTM bestimmt. Durch die Zählung lebender Zellen konnte ein Wert von 95 % Zellrückhaltung ermittelt werden. Dabei änderte sich die Konzentration an Sophoroselipiden im Permeat auf 10,4 g/l von 13,4 g/l im Feed. Das heißt, dass durch den Trennprozess zwar Sophoroselipide zurückgehalten wurden, allerdings deutlich weniger als Zellen. Deshalb konnte die Absetzung im Ruhegefäß durchgeführt werden. Durch die kurzen Einsatzzeiten konnten allerdings nur 5 g Sophoroselipid erhalten werden, was bezogen auf das Reaktionsvolumen von 9 l nur einer Konzentration von 0,56 g/l entspricht.

Um eine Ultraschallabtrennung ohne Verstopfungsproblematik durchführen zu können, wurde eine weitere Kultivierung mit Glucose-Zufütterung von 50 g/(l·d) und mit einem 50 l/d-Ultraschalltrenngerät durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind im Folgenden beschrieben.

3.3.3.2. Bioreaktorkultivierung mit Glucose-Zufütterung von 50 g/(l·d), mit integrierter Ultraschall-Zellabtrennung

Da Kultivierungsbedingungen mit einer Glucose-Zufütterung von 50 g/(l·d) im Laufe der durchgeführten Arbeit die besten Ausbeuten an Sophoroselipid erbracht hatten (s. Kap. 3.3.2.3), sollte ein Versuch durchgeführt werden, bei dem das Ultraschalltrennverfahren in einen Prozess unter diesen Bedingungen integriert wurde. Um ein Verstopfen wie im zuvor durchgeführten Versuch zu vermeiden, wurde ein größeres Ultraschalltrenngerät zur Trennung von 50 l/d verwendet. Die während der Kultivierung aus dem Bioreaktor entnommenen Proben weisen die Parameter auf, die in Abb. 47 dargestellt sind.

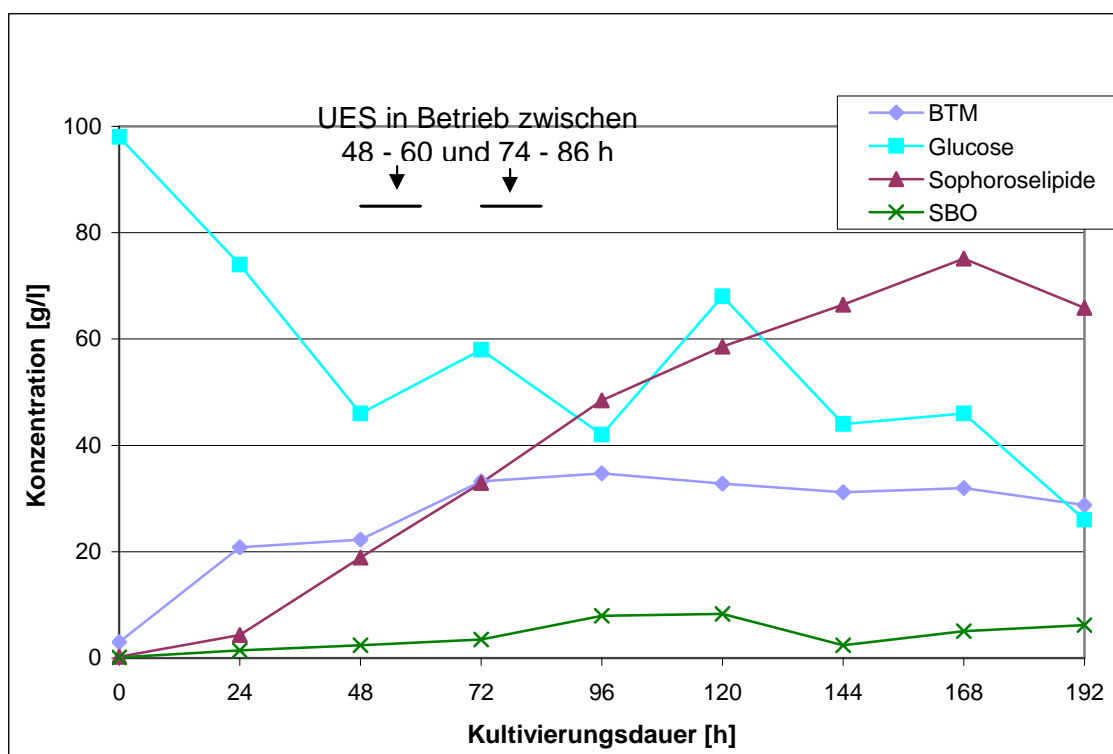


Abb. 47: Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit Glucose (50 g/(l·d))- und SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebener Glucose: 450 g/l, Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 39,9 g/l. UES wurde nach 48 h für 12 h und nach 72 h für 12 h verwendet, Details s. Text.

Durch die Kultivierung konnte eine relativ hohe Produktkonzentration von 65,8 g/l erzielt werden. Dabei wurde eine Menge von SBO eingesetzt, die mit 39,9 g/l zwischen denen der beiden bereits durchgeführten Kultivierungen mit einer Glucose-Zufütterungsrate von 50 g/(l·d) (s. Kap. 3.3.2.3) lag. Das lag daran, dass einerseits eine möglichst große Menge an Sophoroselipiden produziert werden sollte, andererseits aber möglichst gute Bedingungen zur Ultraschallzelltrennung herrschen sollten.

Die Ultraschallseparation wurde nach 48 h in Betrieb genommen und für 12 h ohne größere Störungen sowie nach 72 h noch einmal für weitere 12 h betrieben. Die dabei erzielte Trennleistung betrug im Mittel 99 % bezogen auf lebende Zellen. Auch in diesem Versuch war die Produktkonzentration beim ersten Abschnitt der Trennung im Permeat geringer als im Feed, und zwar um 2,6 g bzw. 13 %. Dieser Unterschied hatte allerdings nur geringe Auswirkungen auf die Produktabtrennbarkeit. So konnten durch Absetzen in dem Ruhegefäß 72,2 g bzw. 8,0 g/l Sophoroselipide, bezogen auf die 9 l Arbeitsvolumen des Reaktors, abgetrennt werden. In Tab. 17 sind die ermittelten Parameter noch einmal zusammengefasst.

Tab. 17: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter einer Kultivierung mit *C. bombicola* mit 50 g/(l·d) Glucose-Zufütterung mit integrierter Ultraschallabtrennung, bestimmt zum Ende der Kultivierung nach 192 h.

Glucosezugabe gesamt	450 g/l
Glucoseverbrauch	424 g/l
SBO-Zugabe gesamt	39,9 g/l
SBO-Verbrauch	33,7 g/l
Biomasse (BTM)	28,8 g/l
Sophoroselipide - Bioreaktor	65,8 g/l +
- Absetzgefäß	8,0 g/l
P_V	8,2 g/(l·d)
$Y_{SL/X}$	2,56
$Y_{SL/(Gluc + SBO)}$	0,15

4 Diskussion

Die Herstellung von Sophoroselipiden mit Hefen der Gattung *Candida* ist seit ihrer Entdeckung in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts intensiv untersucht worden. So wurden neben *Candida bombicola*, die zunächst als *Torulopsis bombicola* klassifiziert worden war, u. a. die Arten *C. apicola*, *C. apis*, *C. magnoliae* und *C. bogoriensis* als Sophoroselipid-Produzenten gefunden. Diese bilden Glycolipidgemische mit stark abweichenden Zusammensetzungen, die dennoch gemeinsame Merkmale aufweisen. Alle weisen als Zucker-Komponente das Disaccharid Sophorose auf, das aus zwei β -1,2 verknüpften Glucose-Untereinheiten besteht. Daran sind an der 1'-Position der Sophorose die hydrophoben Teile des Moleküls glycosidisch gebunden, welche eine große Vielfalt aufweisen können. Die Hauptkomponenten dieser Gemische sind allerdings die gesättigten Fettsäuren Stearinsäure oder Palmitinsäure sowie die einfach ungesättigte Ölsäure. Diese sind an ihrer ω - oder (ω -1)-Position hydroxyliert und dort an die Sophorose gebunden. Eine weitere Bindung der Fettsäure an den hydrophilen Molekülteil erfolgt dabei durch Lactonisierung der Säure-Funktion mit der 4''-Sophorose-Position erfolgen. Schließlich gibt es eine weitere Strukturdifferenzierung durch die partielle oder vollständige Acetylierung der 6'- und 6''-Positionen. Die Zusammensetzungen der Produktgemische verschiedener *Candida*-Arten wurden zunächst beschrieben von Tulloch et al. 1968a sowie Asmer et al. 1988 für *C. bombicola*, Hommel et al. 1987 sowie Weber et al. 1990 für *C. apicola* und Tulloch et al. 1968b und Esders & Light 1972 für *C. bogoriensis*. Allerdings wurde auch schon frühzeitig erkannt, dass die Produktzusammensetzung der gefundenen Sophoroselipidgemische nicht nur vom Produzenten abhängig ist, sondern auch von den Kohlenstoffquellen beeinflusst wird, auf denen die Kultivierung durchgeführt wird. Dadurch lassen sich die Kettenlänge des hydrophoben Molekülteils, die Anzahl und Position der Doppelbindungen sowie die Position der Hydroxygruppe verändern. Die Vielzahl der durchgeführten Arbeiten auf diesem Gebiet lässt eine vollständige Übersicht im Rahmen dieser Arbeit nicht zu; deshalb sollen im Weiteren einige bedeutsame Beispiele gezeigt werden.

Bereits in (Tulloch et al. 1962) konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Sophoroselipiden mit *C. bombicola* durch die Verwendung von hydrophoben Co-Substraten wie Ölsäure-Methylester neben Glucose stark angeregt wird. Jones und Howe untersuchten die Bildung von Sophoroselipiden durch *C. bombicola* mit

verschiedenen aliphatischen Co-Substraten wie Alkanen der Kettenlängen C₁₂ bis C₂₄ sowie einfach ungesättigten Alkenen (Jones & Howe 1968a), verzweigten Alkanen (Jones 1968) sowie Halogen-, Cyano- und Ether-Derivaten (Jones & Howe 1968b). Dabei ließ sich feststellen, dass die Struktur des eingesetzten Co-Substrates die Zusammensetzung des Sophoroselipidgemisches in der Weise beeinflusst, dass das eingesetzte Co-Substrat nach Oxidation zur entsprechenden Fettsäure und anschließender Hydroxylierung an der ω - oder (ω -1)-Position ohne weitere Veränderung der Kettenlänge in einen großen Teil der Sophoroselipidmoleküle inkorporiert wird. Dies gilt vor allem für Co-Substrate der Kettenlängen C₁₆ bis C₁₉. Werden allerdings Moleküle größerer Kettenlänge verwendet, werden hauptsächlich hydrophobe Sophoroselipidkomponenten der Kettenlängen C₁₇ oder C₁₈ gefunden. Die Co-Substrate werden also durch vorherige β -Oxidation modifiziert, bevor sie in das Sophoroselipidmolekül eingebaut werden. Kürzere Co-Substrat-Moleküle der Kettenlängen C₁₄ oder C₁₅ wiederum werden zunächst um C₂-Gruppen verlängert und erst danach in das Produktmolekül eingebaut.

Cooper und Paddock verwendeten als hydrophobe Co-Substrate Pflanzenöle, u. a. Sonnenblumen-, Mais- und Distelöl (Cooper & Paddock 1984) und konnten mit Glucose und Sonnenblumenöl (SBO) relativ hohe Konzentrationen an Sophoroselipiden von 67 g/l erzielen. In (Hommel et al. 1987 und Stüwer et al. 1987) wurden unterschiedliche hydrophobe Co-Substrate wie Alkane, Palmitinsäure und deren Methylester oder SBO bei der Kultivierung von *C. apicola* verwendet und dabei Sophoroselipidkonzentrationen bis 90 g/l erzielt (Glucose und SBO). (Asmer et al. 1988) konnten zeigen, dass die Produktion von Sophoroselipiden mit *C. bombicola* auch durch die Verwendung von Ölsäure als alleinigem Substrat erreicht werden konnte mit Konzentrationen von bis zu 77 g/l. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten durch Einsatz von Pflanzenölen als Co-Substraten neben Glucose und Verbesserung der Kultivierungsführung hohe Konzentrationen an Sophoroselipiden erzielen (u. a. Inoue 1988: Palmöl, 120 g/l; Zhou et al. 1992: Distelöl, 135 g/l; Zhou & Kosaric 1995: Canolaöl, 160 g/l; Rau et al. 2001: Rapsöl, 300 g/l, Gumienna et al. 2005: Mineralöl, 120 g/l, Kim et al. 2009: Rapsöl, 365 g/l). Besonders hohe Ausbeuten ließen sich durch den Einsatz von Glucose und Rapsöl-Fettsäure-Ethylester (Davila et al. 1992, Davila et al. 1997, > 300 g/l) sowie Single Cell Oil und Rapsöl (Daniel et al. 1998, > 400 g/l) erzielen. Auch in (Pekin et al. 2005) wurden Kultivierungen von *C. bombicola* mit hohen Produktkonzentrationen von > 400 g/l durch Kultivierung mit Honig und

Maisöl beschrieben. Weiterhin wurden auch tierische Fette als Co-Substrate verwendet, u. a. von Desphande und Daniels, die dadurch Konzentrationen von 120 g/l Sophoroselipiden erreichten (Desphande & Daniels 1995). In vielen Arbeiten wurde offensichtlich, dass die verwendeten Co-Substratmoleküle vorzugsweise mit unveränderter Kettenlänge in das Sophoroselipidmolekül eingebaut wurden. Dies gilt allerdings nur für Substrate, die eine Kettenlänge von C₁₆ bis C₁₉ aufweisen, andere Substrate werden zunächst zum großen Teil verlängert oder verkürzt, um die bevorzugte Kettenlänge zu erreichen. Generell werden die Co-Substrat-Moleküle zunächst zu ω - oder (ω -1)-Fettsäuren oxidiert, bevor sie in das Sophoroselipidmolekül eingebaut werden (Cavalero & Cooper 2003). Weiterhin können die Substratmoleküle durch das Einbringen von Doppelbindungen in die Kohlenstoffkette modifiziert werden.

Auch die Verwendung anderer hydrophiler Substrate außer Glucose wurde untersucht, und zwar haben (Klekner et al. 1991) festgestellt, dass *C. bombicola* mit Saccharose als Substrat ähnliche Mengen an Sophoroselipiden bildet wie mit Glucose.

Durch die Verwendung von 2-Alkanolen als Co-Substrate konnten neuartige Alkylsophoroside mit *C. bombicola* hergestellt werden (Brakemeier et al. 1995). Die verwendeten Fettalkohole der Kettenlängen C₁₂, C₁₄ und C₁₆ wurden zum größten Teil unverändert an Sophorose gebunden. Dabei wurde bevorzugt der S-konfigurierte Alkohol verwertet (88 % für 2-Dodecanol, Brakemeier et al. 1998b). Auch die Verwendung der analogen Ketone führte zu der Bildung derselben Alkylsophoroside (Brakemeier et al. 1998a).

In (Shah & Prabhune 2007) wurde Arachidonsäure als Co-Substrat neben Glucose verwendet und dadurch Ausbeuten von 1,4 g/l Sophoroselipide erzielt. In diesen wurden als hydrophobe Bestandteile 20-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraensäure (20-HETE) und 19-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraensäure (19-HETE) gefunden. Weitere Arbeiten beschäftigen sich mit der Verwendung günstiger Komplexmedien; so wird in (Fleurackers 2006) die Verwendung von Biodiesel, Frittierfett oder Methylestern von Kokos- und Palmöl als lipophile Co-Substrate beschrieben. Auch durch Kultivierung auf Komplexmedium aus Soja- (Solaiman et al. 2007) oder Zuckerrohr-Melassen (Daverey & Pakshirajan, 2008) konnten Sophoroselipide in Konzentrationen von 53 g/l bzw. 63,7 g/l produziert werden. Schließlich beschreiben (Ashby et al. 2008) den Einfluss der Co-Substrate Palmitinsäure, Stearinsäure,

Ölsäure und Linolsäure auf die Zusammensetzung und Eigenschaften der Sophoroselipidgemische.

4.1. Tests verschiedener Co-Substrate für die Sophoroselipid-Bildung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten ebenfalls verschiedene Co-Substrate auf ihre Eignung untersucht werden, mit *C. bombicola* Sophoroselipide in hohen Konzentrationen zu produzieren oder neuartige Sophoroselipidgemische zu erzeugen. Dazu wurden verschiedene Alkane, Fettalkohole, Ölsäuren und Pflanzenöle als Co-Substrate verwendet, um im Schüttelkolben-Maßstab die Produktbildung zu untersuchen. Außerdem sollte untersucht werden, ob Saccharose als hydrophile C-Quelle zur Bildung von Sophoroselipiden geeignet ist.

4.1.1. Zucker als Substrate

Zunächst wurden Kultivierungen ausschließlich mit den hydrophilen C-Quellen Glucose und Saccharose durchgeführt, um den Einfluss von zwei alternativen hydrophilen C-Quellen zu untersuchen (s. Kap 3.1.1). Die dadurch erzielten Kultivierungsparameter Biomassekonzentration, Sophoroselipidkonzentration und Restsubstrat unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Auch die pH-Werte lagen bei beiden Kultivierungen im Optimumsbereich für die SL-Produktion von 3-4 (Göbbert et al. 1984). Die Auftrennung der Sophoroselipidgemische durch DC konnte auch keine Unterschiede in der Produktzusammensetzung aufzeigen. Damit decken sich diese Ergebnisse mit den Untersuchungen von (Klekner et al 1991), dass die Sophoroselipidbildung nicht wesentlich von dem eingesetzten hydrophilen Substrat Glucose oder Saccharose beeinflusst wird. Die Zusammensetzung der hydrophoben Produktanteile wurde anschließend durch Gaschromatographie nach saurer Methanolyse der Glucose-Produkte bestimmt. Zusammenfassend kann man sagen, dass gesättigte oder einfach ungesättigte Lipidkomponenten der Kettenlängen C₁₆ oder C₁₈ mit einer Hydroxy-Gruppe in (ω -1)- oder ω -Position überwiegen. Dies ist auch das in der oben genannten Literatur beschriebene vorwiegende Produktmuster.

4.1.2. Alkane als Co-Substrate

Um eine Vergleichsmöglichkeit an die Hand zu bekommen, mit der die Qualität der Kultivierung in Abhängigkeit von den verwendeten Co-Substraten abgeschätzt werden konnte, wurden auch Kultivierungen mit Co-Substraten durchgeführt, von denen bekannt ist, dass mit ihnen gute Produktausbeuten erzielt werden können (Jones & Howe 1968a). Deshalb wurde zunächst n-Hexadekan als Co-Substrat eingesetzt. Als weiteres Alkan wurde das technische Gemisch Mihagol-S verwendet, das zu mehr als 85 % aus n-Alkanen der Kettenlängen C_{14} und C_{15} besteht und zu geringen Anteilen aus solchen der Kettenlängen C_{13} und C_{16} .

Durch die Kultivierung mit Mihagol-S entstehen Produkte mit variablerer Zusammensetzung, was sowohl durch die Auftrennung mittels DC als auch durch GC-Analytik der hydrophoben Produktkomponenten nach saurer Methanolyse verdeutlicht wird. Die zusätzlichen Produktspezies lassen sich durch die variablen Kettenlängen der n-Alkane erklären, die in Mihagol-S enthalten sind. Wie in der oben genannten Literatur beschrieben, werden Alkane der Kettenlängen C_{16} bis C_{19} nach enzymatischer Oxidation mit unveränderter Kettenlänge in das Produkt integriert, während kürzere Ketten durch Verlängerung der Kohlenstoffkette um C_2 -Körper zunächst auf diese Länge angepasst werden. Dies hat auch bei den meisten Produkten der Kultivierung mit Mihagol-S stattgefunden, so dass ca. 75 % der gefundenen Produkte in der Hydroxy-Fettsäure eine Kettenlänge von C_{16} bis C_{18} aufweisen. Nur etwas mehr als 10 % der gefundenen hydrophoben Anteile zeigen Kettenlängen von C_{14} oder C_{15} . Insgesamt entspricht dieses Muster den in der Literatur gefundenen Verteilungen.

4.1.3. Fettalkohole als Co-Substrate

Auch bei der Verwendung von Fettalkoholen als Co-Substraten wurden zunächst 2-Dodecanol und 2-Tetradecanol als bekannte Co-Substrate verwendet, um eine Vergleichsmöglichkeit mit Literaturdaten (Brakemeier et al. 1995) zu erhalten. Allerdings wurde hier Saccharose als hydrophiles Substrat verwendet. Die Ergebnisse sind mit denen von Brakemeier et al. leider nicht zu vergleichen, dort konnten sehr viel höhere Produktkonzentrationen von 16 g/l (2-Dodecanol) bzw. 23 g/l (2-Tetradecanol) erzielt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die

Umsetzung grundsätzlich erfolgreich durchgeführt werden kann, da die Kultivierung mit 2-Tetradecanol Produktkonzentrationen von 9 g/l ergab.

Neben den bekannten sekundären Fettalkoholen wurden aber auch langkettige, teilweise verzweigte Alkohole verwendet, bei denen sich die Hydroxygruppe nicht an der 2-Position befindet, sondern in der Mitte der Kohlenstoffkette: Speziol 936U, das als Hauptkomponente Isooleylalkohol enthält, 2-Ethyl-1-Hexanol sowie Rilanit G16, dessen Hauptkomponente 2-Hexyl-1-Decanol ist (s. Abb. 16, S. 49). Dabei konnten mit Speziol 936U und Rilanit G16 relativ gute Produktkonzentrationen von 8 g/l mit Glucose und 13 g/l mit Saccharose bzw. 7 g/l mit Glucose und 6 g/l mit Saccharose erzielt werden. Die Produktkonzentrationen mit 2-Ethyl-1-Hexanol waren sehr gering, was wahrscheinlich an der zu kurzen Kettenlänge liegen dürfte. Aus der Literatur ist bekannt, dass Alkane mit zu kurzen Kettenlängen nicht zu guten Produktausbeuten führen sondern im schlechtesten Fall toxisch für die verwendeten Hefen sind. Nach Auftrennung der Produkte mit DC ergab sich bei den meisten untersuchten Substratkombinationen das bekannte Peakmuster der klassischen Sophoroselipidzusammensetzung, die bei Auftrennung mit Normalphasen-Material aus einem Hauptpeak mit hohem R_f -Wert und einigen kleineren Nebenpeaks mit geringeren R_f -Werten besteht. Diesen Peaks lassen sich im Allgemeinen folgende Produkte zuordnen: Der Hauptpeak entspricht dem in Abb. 2 (S. 7) gezeigten ringförmigen Sophoroselipid, dessen hydrophobe Seitenkette glycosidisch und lactonisch an Sophorose gebunden ist. Die Nebenpeaks lassen sich Produkten, deren hydrophobe Seitenkette nicht lactonisch an Sophorose gebunden ist, Produkten anderer Kettenlängen oder unterschiedlicher Acetylierungsgrade an den C_6 -Positionen zuordnen. Allerdings zeigte die Auftrennung auch ungewöhnliche Bandenmuster bei den Produkten der Kultivierungen mit Glucose und Rilanit G 16. sowie Saccharose und 2-Ethyl-1-Hexanol. Nachdem auch deren hydrophobe Anteile durch GC nach saurer Methanolyse analysiert worden waren, zeigte sich durch anschließende Feinauftrennung mit MPLC und spektroskopische Strukturaufklärung, dass mit Rilanit G16 als Co-Substrat tatsächlich ein ungewöhnliches Produkt gebildet worden war (s. Abb. 20, S. 55). In diesem ist die hydrophobe Seitenkette glycosidisch so an Glucose gebunden, dass ein verzweigter hydrophober Rest entsteht. Diese Molekülstruktur hat möglicherweise neue, interessante Eigenschaften zur Folge. Der eigentliche Synthesevorgang des Produktes ist dabei keineswegs ungewöhnlich, da der direkte Einbau der hydrophoben Co-Substrate ein häufig beschriebener Weg bei

der Herstellung von Sophoroselipiden ist. Auch dass ein Teil des Substrates (5 % nach GC-Analyse) vor der Incorporation in das Produktmolekül zur Säure oxidiert wurde, so dass zunächst 10-Hydroxy-2-Hexyl-Decansäure entsteht, ist ein aus der Literatur hinlänglich bekannter Vorgang. Auch die Entstehung von Glucoselipiden neben den Sophoroselipiden beim Einsatz von Fettalkoholen als Co-Substraten ist bei (Brakemeier et al. 1998b) bereits beschrieben. Dadurch konnte allerdings gezeigt werden, dass die Verwendung von Co-Substraten ungewöhnlicher Struktur zu neuen Produkten mit neuen Eigenschaften führen kann.

Interessant ist in diesem Zusammenhang allerdings eine Strukturanalogie des neu gefundenen Produktes zu den Sophoroselipiden aus *C. bogoriensis* (Esders & Light 1972). Auch in diesen Produkten ist die hydrophobe Seitenkette des Sophoroselipid-Produktes nicht durch eine endständige Hydroxygruppe an die Sophorose gebunden, sondern durch eine Hydroxygruppe an der C₁₃-Position einer C₂₂-Fettsäure. Es scheint, dass Hefen der Gattung *Candida* grundsätzlich die Enzyme besitzen, die Synthese in dieser Form zu katalysieren.

4.1.4. Fettsäuren als Co-Substrate

Auch wenn die Produktkonzentrationen, die in den Schüttelkolbenkultivierungen mit Ölsäure und Erukasäure als Co-Substraten erzielt wurden, kleiner sind als die in der Literatur beschriebenen, hat dennoch eine Produktbildung stattgefunden. Aus den dünn-schichtchromatographischen Auftrennungen der Kultivierungsprodukte (Abb. 23, S. 57) kann man erkennen, dass die Hauptkomponenten der Kultivierungen mit Ölsäure und Erukasäure jeweils identische R_F-Werte haben. Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Kultivierungen mit Erukasäure keine neuartigen Produkte ergeben haben, sondern wahrscheinlich klassische, aus der Literatur bekannte Sophoroselipide gebildet wurden.

4.1.5. Pflanzliche Öle als Co-Substrate

Vergleicht man die erzielten Produktkonzentrationen bei den Kultivierungen mit pflanzlichen Ölen als Co-Substraten mit Literaturdaten, so erkennt man, dass die erzielten Produktkonzentrationen der Umsetzungen mit SBO und Calendulaöl und

Glucose in etwa denjenigen aus der Literatur bekannten entsprechen. Die weiteren Substratkombinationen erzielten geringere Produktkonzentrationen, wobei die Umsetzung mit Senföl nahezu überhaupt nicht stattgefunden hat (1 g/l). Die Analyse der Produktzusammensetzungen durch DC zeigt im Wesentlichen bekannte Bandenmuster für Kultivierungen mit Rapsöl, SBO und Senföl. Nach der Analyse der hydrophoben Komponenten durch GC-MS nach saurer Methanolyse ergab sich, dass bei der Kultivierung mit SBO hauptsächlich die bekannten hydrophoben Anteile in die Sophoroselipidmoleküle eingebaut werden, wobei die häufigste Lipidkomponente Ölsäure ist. Das ist kaum überraschend, da Ölsäure die am häufigsten vorhandene Fettsäure (ca. 82 %) in SBO darstellt. Auch bei der Kultivierung mit Calendulaöl wurden die häufigsten Lipidanteile der Co-Substrate in die Produktmoleküle eingebaut. Allerdings wird Calendulasäure (s. Abb. 27, S. 61), die mit 55-60 % die Hauptkomponente des Calendulaöls darstellt, bei Kultivierungen mit diesem Öl nicht gänzlich ohne vorherige Modifikation in das Produkt eingebaut. Die Anzahl der Doppelbindungen wurde zuvor reduziert, da keine hydrophoben Anteile mit drei Doppelbindungen mehr detektiert werden konnten. Allerdings wurde bei der überwiegenden Anzahl der Komponenten die Länge der Kohlenstoffkette nicht verändert, so dass die Variation im Sättigungsgrad hier die einzige Modifikation dargestellt hat.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Calendulaöl sich als geeignetes Substrat zur Herstellung von ungewöhnlichen SL herausgestellt hat. Allerdings zeigte sich auch, dass in einigen Kultivierungen mit Co-Substraten (beispielhaft seien hier die Kultivierungen mit 2-Ethyl-1-Hexanol oder mit Senföl) geringere Konzentrationen an BTM und/oder Sophoroselipiden erzielt werden konnten als in Kultivierungen ohne Co-Substrate. Dies lässt auf inhibierende Eigenschaften einiger Co-Substrate schließen, z. B. wurde schon die geringe Kettenlänge von 2-Hexyl-1-Hexanol als Grund genannt.

4.2. Separationsexperimente

Um einen Prozess zur Sophoroselipidproduktion mit *C. bombicola* mit integrierter Zellrückhaltung zu etablieren, wurden Ultraschalltrennung und Membranfiltration als Trennverfahren charakterisiert.

4.2.1. Ultraschall-Zellabtrennung mit *Candida bombicola*

Zunächst wurde in grundlegenden Versuchen festgestellt, dass die Ultraschall-Zellabtrennung durch Ultrasonically Enhanced Settling (UES) bei *C. bombicola*-Zellen durchführbar ist mit einer guten Trennleistung von 93 % mit dem 10 l/d-Gerät und von 98,9 % mit dem 50 l/d-Gerät, was in etwa der maximal erzielbaren Trennleistung des Gerätes mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entspricht (Radel 2009).

Außerdem sollte untersucht werden, ob die Überlebensfähigkeit der *C. bombicola*-Zellen durch die Behandlung während des UES beeinträchtigt wird. Der Anteil an toten Zellen wurde durch Anfärben mit Propidiumiodid bestimmt, da eine Färbung der lebenden Zellen mit Fluoresceindiacetat nicht möglich war. Dies kann zum einen daran liegen, dass *C. bombicola* nicht die passenden Enzyme besitzt, um die Acetatreste von FDA abzuspalten und so Fluorescein freizusetzen. Andererseits sind gerade wichtige Enzyme, die zur Herstellung von Sophoroselipiden benötigt werden, der Klasse der Esterasen und speziell den Lipasen zuzuordnen. Deshalb ist es für *C. bombicola* von besonderer Bedeutung, die Aktivität dieser Enzyme streng zu regulieren. Aus diesem Grund könnte die Aktivität der Esterasen bei *C. bombicola* abhängig vom Zellzyklus sein, so dass unter bestimmten physiologischen Zuständen der Lebendnachweis mit FDA nicht durchgeführt werden kann. Die Ergebnisse zeigten, dass die Anteile überlebender Zellen vor und nach der Behandlung der Zellen mit UES im Rahmen der Messungenauigkeiten identisch waren. Dieses Ergebnis war bereits für die Ultraschallmanipulation von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen gefunden worden (Radel et al. 2000).

Da eine Anwendung von UES zur Zellabtrennung bei *C. bombicola* also möglich ist und außerdem die Überlebensfähigkeit der Zellen nicht negativ beeinträchtigt, wurden weitere Versuche durchgeführt, um verschiedene Einflussgrößen der Trennleistung zu bestimmen.

Zunächst wurde der Einfluss des Permeat-Durchflusses pro Zeiteinheit bestimmt. Wie aus Abb. 31 (S. 67) ersichtlich wird, ist die Trennleistung stark abhängig vom Permeat-Durchsatz. Um dies zu verdeutlichen, ist der lineare Anteil der in Abb. 31 gezeigten Kurve noch einmal vergrößert in Abb. 48 dargestellt.

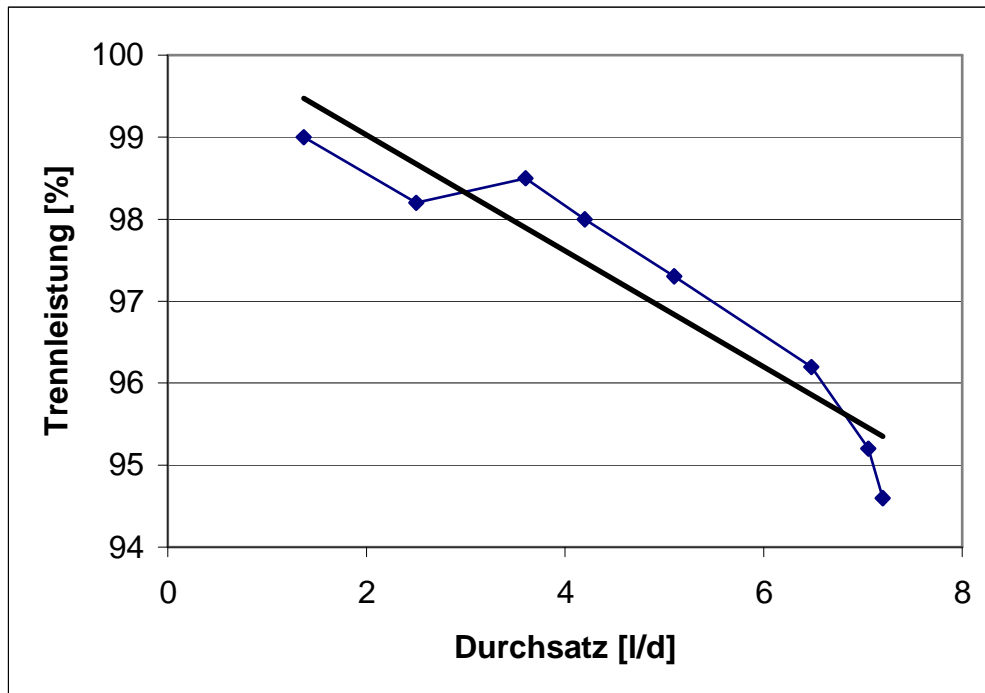


Abb. 48: Trennleistung des 50 l/d-Ultraschalltrenngerätes für *C. bombicola*-Zellen in Abhängigkeit vom Permeat-Durchsatz, Darstellung der annähernd linearen Abhängigkeit der Messwerte im Intervall $1,4 < \text{Durchsatz} < 7,2$.

Bei einer linearen Regression der gemessenen Werte erhält man den Zusammenhang:

$$\text{Trennleistung [\%]} = 100,4 - 0,71 \cdot \text{Permeat-Durchsatz [l/d]}$$

Der dafür ermittelte Korrelationskoeffizient R^2 beträgt 0,89, so dass nur ein annähernd linearer Zusammenhang feststellbar ist, der aber ausreichend sein sollte, um für erwünschte Trennleistungen zwischen 95 und 100 % den zugehörigen Durchsatz zu errechnen.

Zur Verdeutlichung, warum die Trennleistung die gezeigte Abhängigkeit vom Permeat-Durchsatz mit einem so scharfen Schwellenwert hat, soll der Vergleich in Abb. 49 dienen. Dort ist noch einmal die photographische Abbildung des Trenngeräts aus Abb. 30 (S. 64) wiedergegeben, die bei einem Durchsatz von 1,4 l/d entstanden ist. Daneben sieht man die Abbildung des Trenngeräts bei einem Durchsatz von 7,2 l/d.

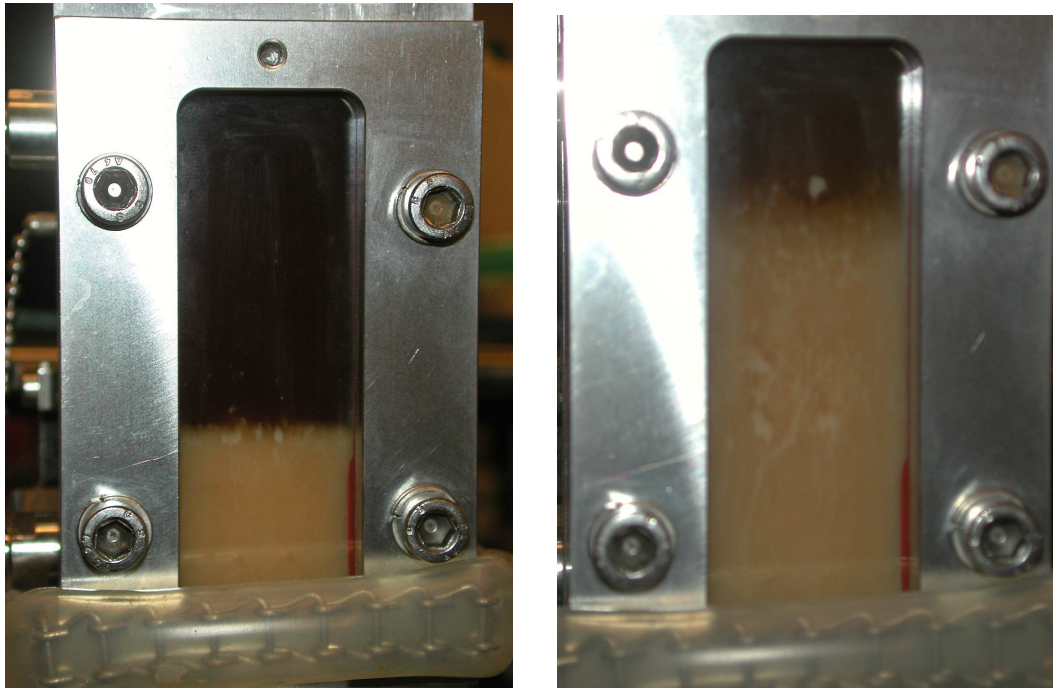


Abb. 49: Photographien des Trennvorgangs von *C. bombicola*-Zellsuspension durch ein 50 L/d Ultraschalltrenngerät bei unterschiedlichen Durchsätzen. Die Aufnahmen zeigen die Vorgänge in der Trennkammer. Links: 1,4 l/d, rechts: 7,2 l/d.

Man kann die unterschiedlichen Wanderungshöhen der Zellen in der Ultraschalltrennkammer deutlich erkennen. Während die Zellen bei einem Durchsatz von 1,4 l/d nur bis ca. 1/3 der Gesamthöhe der Trennkammer wandern, erreichen sie bei einem Durchsatz von 7,2 l/d bereits ca. 3/4 der Strecke.

Dieses Beispiel macht anschaulich, wie es zu dem scharfen Schwellenwert des Trennvorgangs kommt: Bei steigender Strömungsgeschwindigkeit übersteigen die durch die Viskosität der Flüssigkeit an die Zellen weitergegebenen Kräfte die durch Ultraschall wirkenden Strahlungskräfte. Ab einem bestimmten Durchsatz erreicht die Laufront der Zellen den obersten Bereich der Ultraschalltrennkammer, so dass die Zellen nicht mehr zurückgehalten werden können und ausgewaschen werden. Ihre Konzentration im Filtrat steigt stark an und damit sinkt die Trennleistung stark ab. Der exakte Schwellenwert konnte für diesen Trennvorgang nicht ermittelt werden, da die Regulation der Pumpen nicht fein genug möglich war. Er liegt jedoch in einem Bereich zwischen 7,2 und 8,1 l/d. Der grundsätzliche Zusammenhang zwischen Permeat-Strom und Trennleistung entspricht den in der Literatur gefundenen Daten (Gorenflo et al. 2001, Radcliff et al. 2002, Dalm et al. 2005).

Weiterhin wurde der Einfluss der Zellkonzentration im Feed-Strom auf die Trennleistung bestimmt, wobei festgestellt werden konnte, dass die Trennleistung mit

sinkender Zellkonzentration abnimmt. Allerdings muss man beachten, dass die Skalierung der Ordinate in Abb. 32 (S. 68) nur den relativ kleinen Bereich von 94 % bis 100 % umfasst. Das bedeutet, dass die Trennleistung im Wesentlichen nur sehr wenig von der Zellkonzentration beeinflusst wird; dass bei einer eher geringen Konzentration von 1 g/l aber doch ein relativ deutliches Absinken der Trennleistung auftritt. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass für eine gute Trennleistung mit Ultraschalltrennung möglichst hohe Zellkonzentrationen nötig sind. Dies entspricht den Angaben, die in der Literatur (z.B. Benes et al 2001, Radel 2009) gemacht wurden.

Im Weiteren wurden die Auswirkungen der Zusammensetzung der Kultivierungssuspension untersucht; zum einen der Konzentration des Co-Substrates SBO, zum anderen der Konzentration des Produktes Sophoroselipid. Aus den Versuchen, in denen Öl zu einer Modellsuspension aus *C. bombicola*-Zellen, die in Glucose-Medium gewachsen sind, gegeben wird, zeigt sich, dass die Durchführbarkeit der Ultraschalltrennung in hohem Maße davon abhängt, dass eine geringe Ölkonzentration vorherrscht. Schon ab einer Ölkonzentration von 20 g/l sinkt die Trennleistung auf Werte unter 80 % und sinkt dann bei weiterer Ölzugabe stark ab. Das kann dadurch anschaulich erklärt werden, dass die in der Suspension vorliegenden Öltröpfchen den stabilen Zustand in der Ultraschalltrennkammer stören, indem sie aufgrund ihrer geringeren Dichte als Wasser nach oben steigen. Dadurch wird die Zusammenlagerung der Zellen gestört und somit ihr Absinken im Schwerkraftfeld. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Störung der Zellagglomeration erhebliche Auswirkungen auf die Trennleistung des Ultraschallverfahrens hat (Radel et al. 2001). Außerdem wird durch die dispergierten Öltröpfchen das Ultraschallfeld gedämpft, so dass die wirkenden Strahlungskräfte geringer werden. Eine weitere Begründung für den negativen Einfluss des Öls könnte die Anlagerung von *C. bombicola*-Zellen an Öltröpfchen sein, so dass die mit diesen nach oben steigen und ebenfalls nicht durch das Schwerkraftfeld zurückgehalten werden können.

Als weitere Einflussgröße wurde die Konzentration an Sophoroselipiden untersucht. Dazu wurden reale Kultivierungssuspensionen verwendet und sowohl die quantitative als auch die qualitative Zusammensetzung der Suspension hinsichtlich der Sophoroselipide bestimmt. Außerdem wurden mikroskopische Aufnahmen

angefertigt, um eine optische Veränderung der Zusammensetzung durch UES zu bestimmen. Dabei konnten übereinstimmend keinerlei Auswirkungen von UES auf die Sophoroselipide festgestellt werden. Außerdem scheint das Vorhandensein von Sophoroselipiden keinen Einfluss auf die Trennbarkeit der *C. bombicola*-Zellen durch UES zu haben. Damit ist eine weitere Voraussetzung gegeben, um UES erfolgreich zur vereinfachten Aufarbeitung von Sophoroselipiden aus der Kultivierungssuspension einsetzen zu können.

Schließlich kann man zusammenfassend feststellen, dass unter bestimmten Voraussetzungen eine gute Abtrennbarkeit von *C. bombicola*-Zellen durch UES gegeben ist. Die Zellen lassen sich gut durch Ultraschalleinwirkung manipulieren und werden dabei nicht in ihrer Überlebensfähigkeit beeinflusst. Allerdings konnte keine Verbesserung der Lebensfähigkeit der Zellen durch selektive Rückhaltung lebender Zellen im Gegensatz zu abgestorbener Zell-Debris festgestellt werden, wie es für CHO-Zellen berichtet wurde (Miller 2001). Unter geeigneten Bedingungen können Trennleistungen von mehr als 95 % erzielt werden, was den Trennleistungen mit *S. cerevisiae* entspricht und auch zur Durchführung kontinuierlicher Verfahren mit CHO-Zellen ausreichend ist (Miller 2001, Gorenflo et al 2002). Dabei gilt allerdings zu beachten, dass eine ausreichend geringe Co-Substratkonzentration eingehalten werden muss, um die Trennleistung nicht negativ zu beeinflussen. Da hohe Zellkonzentrationen sowohl für die Sophoroselipidproduktion als auch für die Ultraschalltrennleistung vorteilhaft sind, sollte es hier nicht zu unerwünschten Interaktionen kommen. Auch die Sophoroselipidkonzentration beeinflusst die Trennung durch UES nicht negativ. Deshalb wurde UES zur Zellrückhaltung in einen Produktionsprozess mit *C. bombicola* integriert.

4.2.2. Membranfiltration mit *Candida bombicola*

Membranfiltrationen von *C. bombicola*-Suspensionen wurden zunächst als Mikrofiltration mit Porengrößen von 0,1 µm Durchmesser und anschließend als Ultrafiltration mit einem molekularen Cut-Off von 5 kD durchgeführt. Dabei wurden zunächst die *C. bombicola*-Zellen zurückgehalten, was mit einer sehr guten Trennleistung von 99,95 % durchgeführt werden konnte. Die Abnahme der Sophoroselipidkonzentration sowohl im Retentat als auch im Permeat lässt sich

durch Messungenauigkeiten im vorliegenden, eher niedrigen Konzentrationsbereich oder durch Adsorptionseffekte an der verwendeten Membran erklären. Da die Konzentration allerdings nahezu unverändert blieb ($1 \text{ g/l} \pm 0,4 \text{ g/l}$), kann man davon ausgehen, dass die Sophoroselipide die Mikrofiltrationsmembran passieren können. Im daran anschließenden Schritt der Ultrafiltration konnten Trennleistungen für die Sophoroselipide von 71,6 % nach 10 min bzw. 75,9 % nach 30 min festgestellt werden. Dies ist zumindest für eine Aufkonzentrierung des Produktanteils ausreichend, der bereits aus der Lösung präzipitiert ist, so dass der Ultrafiltrationsprozess verwendet werden könnte, um die Produktaufarbeitung zu vereinfachen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Membrantrennung nicht in den Produktionsprozess integriert werden, da die technischen Voraussetzungen nicht gegeben waren. Außerdem sollte das UES-Verfahren als schonendere Art der Zellseparation bevorzugt in den Prozess integriert werden. Da aber die grundsätzliche Durchführbarkeit der Membranfiltration von *C. bombicola*-Suspensionen zur vereinfachten Zellabtrennung und Produktaufarbeitung gezeigt worden war, wurde dieses Verfahren im Rahmen einer Pilotanlage bei dem Unternehmen „ECOVER“, Malle, Belgien, zur Produktion von Sophoroselipiden eingesetzt. Auf Details kann hier nicht näher eingegangen werden, es lässt sich aber feststellen, dass mit Hilfe der genannten Anlage unter Integration der Membranfiltertechnik Sophoroselipide im technischen Maßstab hergestellt werden können.

4.3. Bioreaktorkultivierungen zur Gewinnung von Sophoroselipiden inkl. Tests der Ultraschall-Separationstechnik

Um zu untersuchen, ob die Produktion von Sophoroselipiden mit *Candida bombicola* durch die Anwendung von integrierten Trennverfahren verbessert werden kann, wurden Bioreaktorversuche durchgeführt. Dabei sollten Fütterungsstrategie und Prozessführung optimiert werden, um schließlich den Prozess der Ultraschalltrennung in die Produktion zu integrieren. Dadurch sollte die Produkttrennung erleichtert und die Ausbeute des Prozesses erhöht werden. Bioreaktoren haben gegenüber Schüttelkolben generell neben dem größeren

möglichen Reaktionsvolumen auch den Vorteil der besseren Kontrolle wichtiger Prozessparameter wie Sauerstoffsättigung, pH-Wert oder Substratkonzentration unter aseptischen Bedingungen. Allerdings musste bei der Produktion von Sophoroselipiden mit *C. bombicola* nach Abschluss der Wachstumsphase unter nicht-aseptischen Bedingungen gearbeitet werden, was jedoch für den untersuchten Prozess kein Problem darstellte, da neben dem niedrigen pH-Wert von 3,5 eine hohe Konzentration an erwünschten *C. bombicola*-Zellen vorlag, was das Wachstum von Konkurrenzkeimen unwahrscheinlich machte. So konnte nur bei einer Kultivierung eine Kontamination mit Hefen einer anderen Art mikroskopisch festgestellt werden.

4.3.1. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, ohne Glucose-Nachfütterung

In diesem Versuch konnten 25,3 g/l Sophoroselipid bei einer Biomassekonzentration von 25,1 g/l aus 99,9 g/l Glucose und 41,1 g/l SBO gebildet werden.

Die Produktbildung fand hauptsächlich wachstumsentkoppelt statt, denn sie begann erst in wesentlichem Umfang, nachdem das Wachstum nach 48 h abgeschlossen war. Das exponentielle Wachstum war bereits nach 12 h abgeschlossen, da der pO_2 dort sein Minimum erreichte. Die weitere Erhöhung der Biotrockenmasse erfolgte durch nicht-exponentielles Übergangswachstum und durch Erhöhung der Masse der Einzelzellen durch Einlagerung des hydrophoben Co-Substrates in Speicher-Vakuolen. Die Konzentration an Biomasse änderte sich im Verlauf der Kultivierung nicht mehr wesentlich.

Da *C. bombicola* als Hefe sowohl aeroben als auch anaeroben Katabolismus betreiben kann, ist es wichtig, die Sauerstoffsättigung nicht für längere Zeit unter einen Schwellenwert sinken zu lassen, weil ansonsten die Enzyme für anaeroben Stoffwechsel induziert werden. Da die Bildung von Sophoroselipid aber stark sauerstoffabhängig ist, würde das die Produktivität stark herabsetzen. Deshalb wurde der pO_2 -Wert so geregelt, dass er nicht unter 30 % sinkt. Da sowohl pO_2 als auch pH-Wert sich sehr gut regulieren ließen und die Kurven der Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidbildungsrate bis auf den Zeitpunkt des Ende des exponentiellen Wachstums nur wenige Erkenntnisse über den Prozess liefern, sollten sie nur für diese Kultivierung beispielhaft demonstriert werden. Für die weiteren Kultivierungen wurden diese Ergebnisse aufgenommen, sie werden aber nicht dokumentiert.

Abschließend betrachtet fällt die Produktbildungsrate mit ca. 25 g/l eher gering aus im Vergleich zu Literaturdaten. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass eine hohe Konzentration an Glucose entscheidend ist für die Produktbildung, so dass in späteren Bioreaktorkultivierungen Glucose nachdosiert wurde. Dieser Versuch war nur als Grundlage für die weiteren gedacht, um eine Datenbasis zu erhalten.

4.3.2. Bioreaktorkultivierung mit Glucose/Sonnenblumenöl, mit Glucose-Nachfütterung

Die Reaktorkultivierungen mit steigender Glucose-Nachfütterungsrate sollten dazu dienen, die optimale Fütterungsstrategie zu finden, um eine möglichst hohe Produktausbeute zu erzielen. Dazu wurden jeweils drei Kultivierungen mit Glucose-Zufütterungsraten von 10 g/(l·d), 30 g/(l·d) und 50 g/(l·d) durchgeführt und miteinander verglichen.

Dazu ist grundsätzlich zu sagen, dass die Messungen der Parameter Biotrockenmasse, Sonnenblumenöl und Sophoroselipid relativ großen Schwankungen unterliegen. Diese lassen sich durch die komplexe, vier- oder sogar fünfphasige Kultivierungssuspension erklären, die aus Zellen, wässrigem Medium, Gasblasen, Cosubstrat-Tröpfchen und Produktkristallen zusammengesetzt ist. Das erschwert sowohl die statistisch aussagefähige Probenahme als auch die labortechnische Aufarbeitung der Proben.

Die bei den Kultivierungen erzielten Ergebnisse, wurden teilweise bereits in Kap. 3.3.2.1 bis 3.3.2.3 bewertet, da die Versuche aufeinander aufbauen. Grundsätzlich kann aber außerdem dazu gesagt werden, dass durch die gesteigerte Glucosezugabemenge und die angepasste Zugabe von Co-Substrat die Produktion an Sophoroselipiden von 25,3 g/l ohne Glucose-Zugabe auf 110 g/l mit 50 g/(l·d) gesteigert werden konnte. Dies ist ein Wert, der durch Batch-Prozessführung auch in bereits veröffentlichten Arbeiten erzielt wurde (z.B. Inoue 1988, Zhou et al 1992, Gumienna et al. 2005). Weiterhin wurde in (Rau et al. 2001) festgestellt, dass eine optimale Sophoroselipidproduktion nur durch Aufrechterhalten einer gewissen Glucosekonzentration von mindestens 30 g/l erzielt werden kann. Dieses Ergebnis

konnte in den hier durchgeführten Versuchen auch gefunden werden, da die beste Produktbildung bei der höchsten Glucosezufütterungsrate gefunden werden konnte. Sehr hohe Produktkonzentrationen konnten nur durch optimierte Prozessführung (zweistufige Prozessführung, Daniel et al. 1998 und Daniel et al. 1999; semi-kontinuierliche Prozessführung, Rau et al 2001; Medienaustausch, Pekin et al. 2005) erzielt werden. Deshalb sollte auch hier eine Prozessoptimierung mit integrierter Zellabtrennung durch UES durchgeführt werden.

4.3.3. Bioreaktorkultivierung mit integrierter Ultraschall-Zellabtrennung

Die Ultraschall-Zellabtrennung wurde in zwei Bioreaktor-Kultivierungen integriert. Die erste der beiden diente dabei wieder als Datengrundlage, um einen Vergleichswert zu erhalten, und wurde deshalb ohne Glucose-Zufütterung durchgeführt. Dabei konnten im Reaktor Sophoroselipidkonzentrationen von 53,5 g/l gemessen werden und durch die parallel durchgeführte Ultraschalltrennung mit einem 10 l/d-Gerät mit anschließender Produktseparation weitere 5 g Produkt gewonnen werden, was einer Konzentration bei einem Reaktionsvolumen von 0,56 g/l und, bezogen auf die Konzentration im Reaktor zum vorliegenden Zeitpunkt, 4,2% entspricht. Somit konnten in Summe ca. 54 g/l Sophoroselipid produziert werden. Der erzielte Trenngrad von 95 % ist dabei im Bereich der aus der Literatur bekannten Werte, so dass gezeigt werden konnte, dass die Ultraschall-Zellabtrennung auch mit realen Prozesssuspensionen und im laufenden Bioprozess durchgeführt werden kann.

Anschließend wurde eine Bioreaktorkultivierung mit optimierter Zufütterungsstrategie, d. h. einer Glucosezufütterung von 50 g/(l·d) durchgeführt, in die UES zur Zellrückhaltung und Produktabtrennung integriert werden sollte. Um ein erneutes Verstopfen der UES-Anlage zu vermeiden, wurde ein 50 l/d-Gerät verwendet. Es konnte problemlos für zweimal je 12 h Dauer mit einer Trennleistung von über 99 % betrieben werden, wodurch insgesamt 72,2 g Sophoroselipide abgetrennt werden konnten, was zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung einem Anteil von ca. 23 % der gesamten gebildeten Sophoroselipiden entspricht. Zusammen mit der im Bioreaktor gemessenen Konzentration von 65,8 g/l ergab das eine Produktkonzentration von 73,8 g/l. Dabei musste aufgrund der Empfindlichkeit des UES-Prozesses gegenüber hohen Ölkonzentrationen eine möglichst geringe Co-Substrat-Konzentration

beibehalten werden. Dies lässt noch Raum für Verbesserungen des UES Prozesses, beispielsweise durch bauliche Veränderungen des Gerätes. So könnte eine weitere Trennkammer hinzugefügt werden, um in einem ersten Trennungsschritt zunächst die Ölphase abzutrennen und anschließend bei einer niedrigen Ölkonzentration die eigentliche Zellabtrennung durchzuführen. Dadurch können sicher höhere Produktausbeuten als die hier gezeigten erzielt werden. Damit ist aber grundsätzlich gezeigt, dass UES auch mit dem Produktionssystem *C. bombicola* verwendet werden kann, auch wenn nicht die Prozessstabilität erreicht wurde die z. B. in (Gorenflo et al. 2002) oder (Dalm et al. 2005) beschrieben ist. Dennoch ist das Verfahren, insbesondere angesichts der hohen Trennleistung von 99 %, der guten Überlebensfähigkeit der Zellen und der Abtrenn-Leistung von nahezu 25 % des Produktes, für die Verwendung mit *C. bombicola* zur Sophoroselipidsynthese geeignet.

Es sind neben den schon beschriebenen Versuchen zur Optimierung der Kulturführung von *C. bombicola* noch weitere Versuche beschrieben worden: (Kim et al. 1997) beschreiben einen kontinuierlichen Prozess, bei dem eine Produktivität von 1,8 g/(l·h) erzielt werden konnte. Ein weiterer aus der Literatur bekannter Prozess ist eine kontinuierliche self-cycling Kultivierung mit *C. bombicola* (McCaffrey & Cooper, 1995), bei der durch periodisches Entfernen der Hälfte des Mediums und anschließende Zugabe frischen Mediums stabile *C. bombicola*-Kulturen erzeugt werden konnten, wobei die Cycling-Phasen 2 h länger waren als die Verdopplungszeit der Hefe. In dieser Zeit wurden Sophoroselipide gebildet, wodurch weder die Verdopplungszeit noch die Lebensfähigkeit der Zellen negativ beeinflusst wurden. Die in der Literatur präsentierten Produktivitäten sind zwar höher als die in dieser Arbeit erreichten, allerdings war das Hauptziel der Arbeit die Bewertung der Durchführbarkeit eines prozessintegrierten Verfahrens zur Zellabtrennung, nicht die Optimierung des Gesamtprozesses, die sicherlich daran anschließen sollte.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung von Sophoroselipiden mit der Hefe *Candida bombicola*. Die Arbeit gliedert sich in zwei Teilbereiche:

- Die Herstellung von Sophoroselipiden aus ungewöhnlichen hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolbenmaßstab. Unter den so entstandenen Produkten sollten Neuartige identifiziert und ihre Struktur aufgeklärt werden.
- Die Integration eines Verfahrens zur Zellabtrennung in den Produktionsprozess. Es sollte untersucht werden, ob dadurch die Aufarbeitung des Produktes vereinfacht oder die Produktivität des Prozesses erhöht werden kann.

Da die Zusammensetzung der Sophoroselipidgemische, die mit *C. bombicola* hergestellt werden, stark von den verwendeten hydrophoben Co-Substraten abhängt, wurden dafür verschiedene Pflanzenöle, Fettsäuren oder langkettige Alkohole verwendet. Die Analyse der Produktgemische erfolgte mit Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie mit nachfolgender Massenspektrometrie nach saurer Methanolyse oder Kernspinresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie. Damit konnte gezeigt werden, dass Kultivierungen mit dem Co-Substrat 2-Hexyl-1-Decanol neuartige Produkte ergeben können. Ein Produkt der Kultivierung mit 2-Hexyl-1-Decanol konnte als neuartiges Alkyl-Glucosid mit verzweigtem hydrophoben Anteil identifiziert werden.

Als Verfahren zur Zellabtrennung, das in den Produktionsprozess integriert werden sollte, wurde zunächst die das so genannte Ultrasonically Enhanced Settling gewählt. Dieses relativ neue Verfahren wurde zunächst hinsichtlich seiner Anwendbarkeit mit *C. bombicola* geprüft, bezüglich verschiedener Einflussgrößen charakterisiert und schließlich in einen laufenden Produktionsprozess integriert. Dabei zeigte sich, dass gute Trennleistungen von über 99 % mit hohen Überlebensraten der Zellen erzielbar waren. Allerdings wurde auch deutlich, dass dieses Trennverfahren empfindlich gegenüber hohen Konzentrationen an hydrophobem Co-Substrat von über 25 g/l war. Bei einer Bioreaktorkultivierung von *C. bombicola* mit integrierter Ultraschallzelltrennung konnten ca. 23 % des gebildeten

Produktes aus dem Prozess abgeschieden und dadurch die Produktaufarbeitung deutlich vereinfacht werden.

Des Weiteren wurde die grundsätzliche Durchführbarkeit von aufeinander folgenden Querstrom-Membranfiltrationsschritten im Mikro- und Ultrafiltrationsmaßstab zur Trennung von Zellen und Produkt gezeigt.

6. Literatur

- Akira, S., Akira, Y., 1997. Modification of Wheat Flour Products. Japanese Patent (Kao Corporation, Jpn. Kokai Tokyo, 6pp.) (JP 61205 A2 860911 Showa, JP 85-45850 850308).
- Albrecht, A., Rau, U., Wagner, F., 1996. Initial Steps of Sophorolipid Biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 Grown on Glucose. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**, 67-73.
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K., Foglia, T.A. 2008. Property Control of Sophorolipids: Influence of Fatty Acid Substrate and Blending. *Biotechnol Lett* **30**(6), 1093-1100.
- Asmer, H.-J., Lang, S., Wagner, F., Wray, V., 1988. Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion of Sophorose Lipids. *J Am Oil Chem Soc* **65**, 1460-1466.
- Aulmann, W., Sterzel, W., 1996. Toxicology of Alkyl Polyglycosides. In: Hill, K., von Rybinsky, W. and Stoll, G (eds), *Alkyl Polyglycosides*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 151-167.
- Banat, I.M., Makka, R.S., Cameotra, S.S., 2000. Potential Commercial Application of Microbial Surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 495-508.
- Benes, E., Gröschl, M., Nowotny, H., Trampler, F., Keijzer, T., Bohm, H., Radel, S., Gherardini, L., Hawkes, J.J., König, R., Delouvroy, C., 2001. Ultrasonic separation of suspended particles. *Ultrasonics Symposium 2001* **1**, 649-659.
- Bergström, S., Theorell, H., Davide, H., 1946. On a Metabolic Product of *Ps. pyocyanea*, Pyolipic Acid, Active Against *Mycobact. tuberculosis*. *Ark Kem Mineralog Geolog* **23A**, 1-12.
- Bierau, H., Perani, A., al-Rubeai, M., Emery, A.N., 1998. A comparison of intensive cell culture bioreactors operating with hybridomas modified for inhibited apoptotic response. *J Biotechnol* **62**(3), 195-207.
- Bluth, M.H., Kandil, E., Mueller, C.M., Shah, V., Lin, Y.Y., Zhang, H., Dresner, L., Lempert, L., Nowakowski, M., Gross, R., Schulze, R., Zenilman, M.E., 2006. Sophorolipids Block Lethal Effects of Septic Shock in Rats in a Cecal Ligation and Puncture Model of Experimental Sepsis. *Crit Care Med* **34**, 258-259.
- Boothroyd, B., Thorn, J. A. and Haskins, R. H., 1956. Biochemistry of the Ustilaginales XII. Characterization of Extracellular Glycolipids Produced by *Ustilago* sp. *Can J Biochem Physiol* **34**, 10-14.
- Brakemeier, A., Lang, S., Wulbrandt, D., Merschel, L., Benninghoven, A., Buschmann, N., Wagner, F. (1995). Novel Sophorose Lipids from Microbial Conversion of 2-Alkanols. *Biotechnol Lett* **17**(11), 1183-1188.
- Brakeimeier, A., Wulbrandt, D., Lang, S., 1998a. Microbial Alkyl-Sophorosides Based on 1-Dodecanol or 2-, 3- and 4-Dodecanones. *Biotechnol Lett* **20**, 215-218.
- Brakemeier, A., Wulbrandt, D., Lang, S., 1998b. *Candida bombicola*: Production of Novel Alkyl-Glycosides Based on Glucose / 2-Dodecanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 161-166.
- Brown, W.A., Cooper, D.G., 1991. Self-cycling Fermentation Applied to *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2901-2906.
- Cabrera-Valladares, N., Richardson, A.P., Olvera, C., Treviño, L.G., Déziel, E., Lépine, F., Soberón-Chávez, G., 2006. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) Production Using *Escherichia coli* as a Heterologous Host. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**(1), 187-194.
- Casas, J.A., García-Ochoa, F., 1999. Sophorolipid Production by *Candida bombicola*: Medium Composition and Culture Methods. *J Biosc Bioeng* **88**, 488-494.
- Cavalero, D.A., Cooper, D.G., 2003. The Effect of Medium Composition on the Structure and Physical State of Sophorolipids Produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J Biotechnol* **103**, 31-41.

- Chen, J., Song, X., Zhang, H., Qu, Y., 2006. Production, Structure Elucidation and Anticancer Properties of Sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. *Enzyme Microb Tech* **39**(3), 501-506.
- Chmiel, H., 2006. Aufarbeitung (Downstream Processing). In: Chmiel, H (ed), *Bioprozesstechnik*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, pp. 259-314.
- Cooper, D.G., Paddock, D.A., 1984. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl Environ Microbiol* **47**, 173-176.
- Cornelissen, G., Bertelsen, H.-P., Hahn, B., Schultz, M., Scheffler, U., Werner, E., Leptien, H., Krüß, S., Jansen, A.-K., Gliem, T., Hielscher, M., Wilhelm, B.-U., Sowa, E., Radeke, H.H., Luttmann, R., 2003. Herstellung rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris* in integrierter Prozessführung. *Chem Ing Techn* **75**, 281-290.
- Dalm, M.C., Jansen, M., Keijzer, T.M., van Grunsven, W.M., Oudshoorn, A., Tramper, J., Martens, D.E., 2005. Stable Hybridoma Cultivation in a Pilot-Scale Acoustic Perfusion System: Long-Term Process Performance and Effect of Recirculation Rate. *Biotechnol Bioeng* **91**(7), 894-900.
- Daniel, H.-J., Reuss, M., Syltatk, C., 1998. Production of Sophorolipids in High Concentration from Deproteinized Whey and Rapeseed Oil in a Two Stage Fed Batch Process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Biotech Lett* **20**, 1153-1156.
- Daniel, H.J., Otto, R.T., Binder, M., Reuss, M., Syltatk, C., 1999. Production of Sophorolipids from Whey: Development of a Two-Stage Process With *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 Using Deproteinized Whey Concentrates as Substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 40-45.
- Daverey, A., Pakshirajan, K., 2008. Production, Characterization, and Properties of Sophorolipids from the Yeast *Candida bombicola* using a Low-cost Fermentative Medium. *Appl Biochem Biotechnol*, electronic publication
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science*. 1998 **280**, 226-227.
- Davila, A.M., Marchal, R. and Vandecasteele, J.-P., 1992. Kinetics and Balance of a Fermentation Free from Product Inhibition: Sophorose Lipid Production by *Candida bombicola*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**, 6-11.
- Davila, A.M., Marchal, R., Vandecasteele, J.P., 1997. Sophorose Lipid Fermentation with Differentiated Substrate Supply for Growth and Production Phase. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**, 496-501.
- Desai, J. D. & Banat, I. M., 1997. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiol Molecular Biol Rev* **61**, 47-64.
- Desphande, M., Daniels, L., 1995. Evaluation of Sophorolipid Biosurfactant Production by *Candida bombicola* Using Animal Fat. *Bioresource Technol* **54**, 143-150.
- Develter, D., Fleurackers, S., 2010. Sophorolipids and rhamnolipids. In: Johansson, I., Kjellin, U. R. M. (eds), *Surfactants from Renewable Resources*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK
- Develter, D., Lauryssen, L., 2010. Properties and Industrial Applications of Sophorolipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 628-638.
- Einselle, A., Finn, R. K., Samhaber, W., 1985. *Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik: Eine Einführung. (VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim)*
- Esders, T.W. & Light, R.J., 1972. Characterization and In Vivo Production of Three Glycolipids from *Candida bogoriensis*: 13-Glucopyranosyl-Glucopyranosyl-Oxydocosanoic Acid and Its Mono- and Diacylated Derivatives. *J Lipid Res* **13**, 663-671.
- Eskuchen, R. & Nitsche, M., 1996. Technology and Production of Alkyl Polyglycosides. In: Hull, K., von Rybinski, W., Stoll, G. (eds), *Alkyl Polyglycosides*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 9-22.
- Fabry, B., 1991. Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendung. *Chemie in unserer Zeit* **4**, 214-222.

- Fabry, B., 1994. Tenside - Vergangenheit, Gegenwart und zukünftige Entwicklungen. SÖFW-Journal **120**, 377-386.
- Fiechter, A., 1992. Integrated Systems for Biosurfactant Synthesis. Pure Appl Chem **64**(11), 1739-1743.
- Fiehler, K., 1994. Zur N-regulierten Sophoroselipid-Bildung mit *Candida bombicola*. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Fleurackers, S.J.J., 2006. On the Use of Waste Frying Oil in the Synthesis of Sophorolipids. Eur J Lipid Sci Technol **108**, 5-12.
- Fleurackers, S.J.J., van Bogaert, I., Develter, D., 2010. On the Production and Identification of Medium-Chained Sophorolipids. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **112**, 655–662.
- Fu, S.L., Wallner, S.R., Bowne, W.B., Hagler, M.D., Zenilman, M.E., Gross, R., Bluth, M.H., 2008. Sophorolipids and Their Derivatives are Lethal Against Human Pancreatic Cancer Cells. J Surg Res **148**(1), 77-82.
- Fukuoka, T., Morita, T., Konishi, M., Imura, T., Kitamoto, D., 2007. Characterization of New Glycolipid Biosurfactants, Tri-Acylated Mannosylerythritol Lipids, Produced by *Pseudozyma* Yeasts. Biotechnol Lett **29**(7), 1111-1118.
- Gherardini, L., Radel, S., Sielemann, S., Doblhoff-Dier, O., Gröschl, M., Benes, E., McLoughlin, A., 2001. A Study of the Spatial Organisation of Microbial Cells in a Gel Matrix Subjected to Treatment with Ultrasonic Standing Waves. Bioseparation **10**, 153-162.
- Gherardini, L., Cousins, C.M., Hawkes, J.J., Spengler, J., Radel, S., Lawler, H., Devcic-Kuhar, B., Gröschl, M., Coakley, W.T., McLoughlin, A.J., 2005. A New Immobilisation Method to Arrange Particles in a Gel Matrix by Ultrasound Standing Waves. Ultrasound Med Biol **31**(2), 261-272.
- Giani, C., Wullbrandt, D., Rothert, R., Meiwes, J., 1997. *Pseudomonas aeruginosa* and its Use in a Process for the Biotechnological Preparation of L-Rhamnose. United States Patent 5,658,793 (Hoechst AG, Frankfurt), Anmeldung: 5. 06. 1995, Pat. 19. 08. 1997.
- Göbber, U., Lang, S., Wagner, F., 1984. Sophorose Lipid Formation by Resting Cells of *Torulopsis bombicola*. Biotechnol Lett **6**(4), 225-230.
- Gorenflo, V.M., Smith, L., Dedinsky, B., Persson, B., Piret, J.M., 2002. Scale-up and Optimization of an Acoustic Filter for 200 L/day Perfusion of a CHO Cell Culture. Biotechnol Bioeng **80**, 438-444.
- Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T., Tulloch, A.P., 1961. Hydroxy Fatty Acid Glycosides of Sophorose from *Torulopsis magnoliae*, Can J Chem **39**, 846-855.
- Gröschl, M., 1998. Ultrasonic Separation of Suspended Particles - Part I: Fundamentals. Acta Acust United Ac **84**, 432-447.
- Gröschl, M., Burger, W., Handl, B., Doblhoff-Dier, O., Gaida, T., Schmatz, C., 1998. Ultrasonic Separation of Suspended Particles - Part III: Application in Biotechnology. Acta Acust United Ac **84**, 815-822.
- Gruber, T., Chmiel, H., Käppeli, O., Sticher, P., Fiechter, A., 1993. Integrated Process for Continuous Rhamnolipid Biosynthesis. In: Kosaric N. (ed), Biosurfactants: Production, Properties, Applications, Surfactant Science Series, **48**. M Dekker, New York, Basel, Hong Kong, pp. 157-173.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., Fiechter, A., 1984. *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture With Glucose as Carbon Source. Appl Environ Microbiol **48**(2), 301-305.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., Fiechter, A., 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* Continuous Culture Biosurfactant Production on Nutritional and Environmental Factors. Appl Microbiol Biotechnol **24**, 443-448.
- Guilmanov, V., Ballistreri, A., Impallomeni, G., Gross, R. A., 2002. Oxygen Transfer Rate and Sophorose Lipid Production by *Candida bombicola*. Biotechnol Bioeng **77**, 489-494.
- Gumienna, M., Czarnecka, M., Czarnecki, Z., 2005. Effect of Selected Lipid Substrates on the Process of Biosynthesis of Surface-Active Compounds by the *Candida bombicola* yeasts. EJPAU **8**(2), #12.

- Gunther, N.W., Nuñez, A., Fett, W., Solaiman, D.K., 2005. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. *Appl Environ Microbiol* **71**(5), 2288-2293.
- Gunther, N.W., Nuñez, A., Fortis, L., Solaiman, D.K., 2006. Proteomic Based Investigation of Rhamnolipid Production by *Pseudomonas chlororaphis* Strain NRRL B-30761. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**(11), 914-920.
- Gura, E., 1992. Prozessentwicklung zur Bildung eines verzweigten β -1,3-Glucans. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M., Manresa, A., 2000. Screening and Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from Waste Frying Oils. *J Appl Microbiol* **88**(3), 379-387.
- Haferburg, D., Hommel, R., Claus, R. und Kleber, H.-P., 1986. Extracellular Microbial Lipids as Biosurfactants. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* **33**, 53-93.
- Haferburg, D., Hommel, R., Kleber, H.-P., Kluge, S., Schuster, G und Zschiegner, H.-J., 1987. Antiphytovirale Aktivität von Rhamnolipid aus *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Biotechnol* **7**, 353-356.
- Hardin, R., Pierre, J., Schulze, R., Mueller, C.M., Fu, S.L., Wallner, S.R., Stanek, A., Shah, V., Gross, R.A., Weedon, J., Nowakowski, M., Zenilman, M.E., Bluth, M.H., 2007. Sophorolipids Improve Sepsis Survival: Effects of Dosing and Derivatives. *J Surg Res* **2007** **142**(2), 314-319.
- Hauthal, H.G., 1996. Olympiade der Tenside. *Nachr Chem Tech Lab* **44**, 876-878.
- Hölzl, G., Dörmann, P., 2007. Structure and Function of Glycoglycerolipids in Plants and Bacteria. *Prog Lipid Res* **46**, 225-243.
- Hommel, R., Stüwer, O., Stuber, W., Haferburg, D., Kleber, H.P., 1987. Production of Water-Soluble Surface-Active Exolipids by *Torulopsis Apicola*. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**, 199-205.
- Im, J.H., Yanagishita, H., Ikegami, T., Takeyama, Y., Idemoto, Y., Koura, N., Kitamoto, D., 2003. Mannosylerythritol Lipids, Yeast Glycolipid Biosurfactants, are Potential Affinity Ligand Materials for Human Immunoglobulin G. *J Biomed Mater Res A* **65**(3), 379-385.
- Imura, T., Ito, S., Azumi, R., Yanagishita, H., Sakai, H., Abe, M., Kitamoto, D., 2007. Monolayers Assembled from a Glycolipid Biosurfactant from *Pseudozyma (Candida) antarctica* Serve as a High-Affinity Ligand System for Immunoglobulin G and M. *Biotechnol Lett* **29**(6), 865-870.
- Inoue, S., 1988. Biosurfactants in Cosmetic Applications. In: Applewhite, T.H. (ed), *Proceedings of the World Conference on Biotechnology for the Fats and Oil Industry*, American Oil Chemists' Society, USA, pp. 206-210.
- Inoue, S., Ito, S., 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as Microbial Surfactants in Alkane Fermentations. *Biotechnol Lett* **4**, 3-8.
- Isoda, H., Kitamoto, D., Shinmoto, H., Matasumura, M. and Nakahara, T., 1997. Microbial Extracellular Glycolipid Induction of Differentiation and Inhibition of the Protein Kinase C Activity of Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60. *Biosci Biotech Biochem* **61**, 609-614.
- Ito, S., Inoue, S., 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: Possible Reaction to Alkane Uptake. *Appl Environ Microbiol* **43**, 1278-1283.
- Ito, S., Imura, T., Fukuoka, T., Morita, T., Sakai, H., Abe, M., Kitamoto, D., 2007. Kinetic Studies on the Interactions Between Glycolipid Biosurfactant Assembled Monolayers and Various Classes of Immunoglobulins Using Surface Plasmon Resonance. *Colloids Surf B Biointerfaces* **58**(2), 165-171.
- Jarvis, F.G., Johnson, M.J., 1949. A Glyco-Lipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* **71**, 4124-4126.
- Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., Høiby, N., 2007. Rapid Necrotic Killing of Polymorphonuclear Leukocytes is Caused by Quorum-Sensing-Controlled Production of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**, 1329-1338.

- Jones, D.F., 1968. Microbial Oxidation of Long-Chain Aliphatic Compounds. Part II. Branched-Chain Alkanes. *J Chem Soc* **22**, 2809-2815.
- Jones, D.F., Howe, R., 1968a. Microbial Oxidation of Long-Chain Aliphatic Compounds. Part I. Alkanes and Alk-1-enes. *J Chem Soc* **22**, 2801-2808.
- Jones, D.F., Howe, R., 1968b. Microbial Oxidation of Long-Chain Aliphatic Compounds. Part III. 1-Halogenoalkanes, 1-Cyanoheptadecane, and 1-Alkoxyalkanes. *J Chem Soc* **22**, 2816-2821.
- Kang, S.W., Kim, Y.B., Shin, J.D., Kim, E.K., 2009. Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Biosurfactant, Sophorolipid. *Appl Biochem Biotechnol*, electronic publication
- Kim, S.Y., Oh, D.K., Lee, K.H., Kim, J.H., 1997. Effect of Soybean Oil and Glucose on Sophorolipid Fermentation by *Torulopsis bombicola* in Continuous Culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**, 23-26.
- Kim, Y.B., Yun, H.S., Kim, E.K., 2009. Enhanced Sophorolipid Production by Feeding-Rate-Controlled Fed-Batch Culture. *Bioresour. Technol.* **23**, 6028-6032.
- Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C., Tabuchi, T., 1990. Extracellular Accumulation of Mannosylerythritol Lipids by a Strain of *Candida antarctica*. *Agr Biol Chem* **54**, 31-36.
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Natane, T., Kamisawa, C. and Nakahara, T., 1993. Surface Active Properties and Antimicrobial Activities of Mannosylerythritol Lipids as Biosurfactants Produced by *Candida antarctica*. *J Biotechnol* **29**, 91-96.
- Klekner, V., Kosaric, N., Zhou, Q.H., 1991. Sophorose Lipids Produced from Sucrose. *Biotechnol Lett* **13**, 345-348.
- Konishi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Kakugawa, K., Kitamoto, D., 2007. Production of Different Types of Mannosylerythritol Lipids as Biosurfactants by the Newly Isolated Yeast Strains Belonging to the Genus *Pseudozyma*. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**(3), 521-531.
- Konishi, M., Imura, T., Fukuoka, T., Morita, T., Kitamoto, D., 2007. A Yeast Glycolipid Biosurfactant, Mannosylerythritol Lipid, Shows High Binding Affinity Towards Lectins on a Self-Assembled Monolayer System. *Biotechnol Lett* **29**(3), 473-480.
- Kundt, A., Lehmann, O., 1874. Longitudinal Vibrations and Acoustic Figures in Cylindrical Columns of Liquids. *Ann Phys Chem* **153**, 1-12.
- Lang, S. and Wagner, F., 1993. Biological activities of biosurfactants. In: Kosaric, N. (ed), *Biosurfactants*. In: *Surfactant Series Vol 48*, Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, pp. 251-268.
- Lang, S., Wullbrandt, D., 1999. Rhamnose Lipids – Biosynthesis, Microbial Production and Application Potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 22-32.
- Lang, S., Beil, W., Tokuda, H., Wicke, C., Lurtz, V., 2004. Improved Production of Bioactive Glucosylmannosyl-Glycerolipid by Sponge-Associated Microbacterium species. *Mar Biotechnol* **6**, 152-156.
- Langer, O., Palme, O., Wray, V., Tokuda, H., Lang, S., 2006. Production and Modification of Bioactive Biosurfactants. *Proc Biochem* **41**(10), 2138-2145.
- Lemieux, R. U., 1953. Synthetic Musc from a Metabolic Product of Corn Smut in Artificial Culture. *Perfumery and Essential Oil Record* **44**, 136-139.
- Lequette, Y., Greenberg, E.P., 2005. Timing and Localization of Rhamnolipid Synthesis Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Bacteriol* **187**(1), 37-44.
- Linhardt, R.J., Bakhit, R., Daniels, L., Mayerl, F., Pickenhagen, W., 1989. Microbially Produced Rhamnolipid as a Source of Rhamnose. *Biotechnol Bioeng* **33**, 365-368.
- Lockstoff, O., 1991. Glycolipide als Immunmodulatoren – Synthese und Eigenschaften. *Angew Chem* **103**, 1639-1649.
- Maier, R.M., Soberón-Chávez, G., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis and Potential Applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 625-633.
- Matsufuji, M., Nakata, K., Yoshimoto, A., 1997. High Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* Growing on Ethanol. *Biotechnol Lett* **19**, 1213-1215.
- McCaffrey, W.C., Cooper, D.G., 1995. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* Using Self-Cycle Fermentation. *J Ferment Bioeng* **2**, 146-151.

- Miller, A.O.A., 2001. Combing Cell Culture & Process Operation. Sonoperfusion Allows Direct Feed with Expanded-Bed Chromatography. *Gen* **21**, 29.
- Monteiro, S.A., Sassaki, G.L., de Souza, L.M., Meira, J.A., de Araújo, J.M., Mitchell, D.A., Ramos, L.P., Krieger, N., 2007. Molecular and Structural Characterization of the Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chem Phys Lipids* **147**(1), 1-13.
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, H.K., Kitamoto, D., 2007. Characterization of the Genus *Pseudozyma* by the Formation of Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids. *FEMS Yeast Res* **7**(2), 286-292.
- Mukherjee, S., Das, P., Sen, R., 2006. Towards Commercial Production of Microbial Surfactants. *Trends Biotechnol* **24**(11), 509-515.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B. F., 2001. Heavy Metal Removal from Sediments by Biosurfactants. *J Hazard Mater* **85**, 111-125.
- Mulligan, C.N., 2005. Environmental Applications for Biosurfactants. *Environ Pollut* **133**(2), 183-198.
- Neu, T.R., 1996. Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces. *Microbiol Rev* **60**, 151-166.
- Nguyen, T.T., Sabatini, D.A., 2009. Microemulsions of Rhamnolipid and Sophorolipid Biosurfactants. In: Hayes, D., Kitamoto, D., Solaiman, D., Ashby, R. (eds), *Biobased Surfactants and Detergents. Synthesis, Properties and Applications*. AOCS Press, Urbana, USA, pp. 107–127.
- Nitschke, M., Costa, S.G., Contiero, J., 2005. Rhamnolipid Surfactants: an Update on the General Aspects of these Remarkable Biomolecules. *Biotechnol Prog* **21**(6), 1593-1600.
- Ochsner, U.A., Reiser, J., 1995. Autoinducer-Mediated Regulation of Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 6424-6428.
- Ochsner, U.A., Reiser, J., Fiechter, A. and Witholt, B., 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants in Heterologous Hosts. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3503-3506.
- Ochsner, U.A., Hembach, T., Fiechter, A., 1996. Production of Rhamnolipid Biosurfactants. In: Fiechter, A. (ed), *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, **53**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 89-118.
- Otto, R.T., Daniel, H.-J., Pekin, G., Müller-Decker, K., Fürstenberger, G., Reuss, M., Sylødatk, C., 1999. Production of Sophorolipids from Whey. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**(4), 495-501.
- Pai, R., Doherty, M., Malone, M., 2002. Design of Reactive Extraction Systems for Bioproduct Recovery. *AIChE J* **48**, 514-526.
- Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T., 2007. Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**(6), 2531-2539.
- Parra, J.L., Guinea, J., Manresa, M.A., Robert, M., Mercadé, M.E., Comelles, F., Bosch, M.P., 1989. Chemical Characterization and Physicochemical Behavior of Biosurfactants. *J Am Oil Chem Soc* **66**, 141-145.
- Pekin, G., Vardar-Sukan, F., Kosaric, N., 2005. Production of Sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey. *Eng Life Sci* **5**, 357-362.
- Pui, P.W.S., Trampl, F., Sonderhoff, S.A., Gröschl, M., Kilburn, D.G., Piret, J.M., 1995. Batch and Semicontinuous Aggregation and Sedimentation of Hybridoma Cells by Acoustic Resonance Fields. *Biotechnol Prog* **11**, 146-152.
- Radel, S., McLoughlin, J., Gherardini, L., Doblhoff-Dier, O., Benes, E., 2000. Viability of yeast cells in well controlled propagating and standing ultrasonic plane waves. *Ultrasonics* **38**, 633-637.
- Radel, S., Gherardini, L., McLoughlin, A.J., Doblhoff-Dier, O., Benes, E., 2001. Breakdown of Immobilisation/Separation and Morphology Changes of Yeast Suspended in Water-Rich Ethanol Mixtures Exposed to Ultrasonic Plane Standing Waves. *Bioseparation* **9**, 369-377.

- Radel, S., 2002. Ultrasonically Enhanced Settling: The Effects of Ultrasonic Plane Wave Fields on Suspensions of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Technische Universität Wien.
- Radel, S., 2009. Influence of Biomass, Throughput and True Electric Power Input on the Separation Efficiency of a 60 ml Acoustic Filter. *Elektrotechnik und Informationstechnik* **126**, 1-9.
- Rau, U., Manzke, C., Wagner, F., 1996. Influence of Substrate Supply on the Production of Sophorose Lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Biotechnol Lett* **18**, 149-154.
- Rau, U., Hammen, S., Heckmann, R., Wray, V., Lang, S., 2001. Sophorolipids: a Source for Novel Compounds. *Ind Crops Prod* **13**, 85-92.
- Rau, U., Nguyen, L. A., Roeper, H., Koch, H., Lang, S., 2005. Fed-batch Bioreactor Production of Mannosylerythritol Lipids Secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 607-613.
- Rau, U., Nguyen, L. A., Roeper, H., Koch, H., Lang, S., 2005. Downstream Processing of Mannosylerythritol Lipids Produced by *Pseudozyma aphidis*. *Eur J Lipid Sci Technol* **107**, 373-380.
- Rau, U., Nguyen, L. A., Schulz, S., Wray, V., Nimtz, M., Roeper, H., Koch, H., Lang, S., 2005. Formation and Analysis of Mannosylerythritol Lipids Secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**, 551-559.
- Ramm, W., Schatton, W., Wagner-Döbler, I., Wray, V., Nimtz, M., Tokuda, H., Enjyo, F., Nishino, H., Beil, W., Heckmann, R., Lurtz, V., Lang, S., 2004. Diglucosyl-Glycerolipids from the Marine Sponge-Associated *Bacillus pumilus* Strain AAS3: Their Production, Enzymatic Modification and Properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 497-504.
- Raza, Z.A., Khan, M.S., Khalid, Z.M., 2007. Physicochemical and Surface-Active Properties of Biosurfactant Produced Using Molasses by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **42**(1), 73-80.
- Reiling, H.E., Thanei-Wyss, U., Guerra-Santos, L.H., Hirt, R., Käppeli, O., Fiechter, A., 1986. Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **51**(5), 985-989.
- Richter, K., Nottelmann, S., 2004. An Empiric Steady State Model of Lactate Production in Continuous Fermentation with Total Cell Retention. *Eng Life Sci* **4**, 426-432.
- Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R., 2006. Biosurfactants: Potential Applications in Medicine. *J Antimicrob Chemother* **57**(4), 609-618.
- Rybinski, von, W. und Hill, K., 1998. Alkylpolyglycoside – Eigenschaften und Anwendungen einer neuen Tensidklasse. *Angew Chem* **110**, 1394-1412.
- Ryll, T., Dutina, G., Reyes, A., Gunson, J., Krummen, L., Etcheverry, T., 2000. Performance of Small-Scale CHO Perfusion Cultures Using an Acoustic Cell Filtration Device for Cell Retention: Characterization of Separation Efficiency and Impact of Perfusion on Product Quality. *Biotechnol Bioeng* **69**, 440-449.
- Shah, V., Doncel, G.F., Seyoum, T., Eaton, K.M., Zalenskaya, I., Hagver, R., Azim, A., Gross, R., 2005. Sophorolipids, Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(10), 4093-4100.
- Shah, S., Prabhune, A., 2007. Purification by Silica Gel Chromatography Using Dialysis Tubing and Characterization of Sophorolipids Produced from *Candida bombicola* Grown on Glucose and Arachidonic Acid. *Biotechnol Lett* **29**(2), 267-272.
- Sharma, A., Jansen, R., Nimtz, M., Johri, B.N., Wray, V., 2007. Rhamnolipids from the Rhizosphere Bacterium *Pseudomonas* sp. GRP(3) That Reduces Damping-off Disease in Chilli and Tomato Nurseries. *J Nat Prod* **70**(6), 941-947.
- Schippers, C., Geßner, K., Müller, T., Scheper, T., 2000. Microbial Degradation of Phenanthrene by Addition of a Sophorolipid Mixture. *J Biotechnol* **83**, 189-198.
- Scholz, C., Mehta, S., Bisht, K., Guilmanov, V., Kaplan, D., Nicolosi, R., Gross, R., 1998. Bioactivity of Extracellular Glycolipids - Investigation of Potential Anti-Cancer Activity of Sophorolipids and Sophorolipid-Derivatives. *Polymer Reprints* **39**(2), 168-169.

- Sim, L., Ward, O.P., Li, Z.-Y., 1997. Production and Characterisation of a Biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**, 232-238.
- Singh, P., Cameotra, S.S., 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol* **22**(3), 142-146.
- Solaiman, D.K., Ashby, R.D., Zerkowski, J.A., Foglia, T.A., 2007. Simplified Soy Molasses-Based Medium for Reduced-Cost Production of Sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol Lett* **29**(9), 1341-1347.
- Spencer, J.F., Gorin, P.A., Tulloch, A.P., 1970. *Torulopsis bombicola* sp.n. *Antonie Van Leeuwenhoek* **36**(1), 129-133.
- Stahl, E., 1967. *Dünnschichtchromatographie*, Springer Verlag, Berlin
- Steber, J., Guhl, W., Stelter, N., Schröder, F., 1996. Ecological Evaluation of Alkyl Polyglycosides. in: Hill, K., von Rybinski, W., Stoll, G. (eds), *Alkyl Polyglycosides*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 177-210.
- Stipcevic, T., Piljac, A., Piljac, G., 2006. Enhanced Healing of Full-Thickness Burn Wounds Using Di-Rhamnolipid. *Burns* **32**(1), 24-34.
- Stüwer, O., Hommel, R., Haferburg, D., Kleber, H.P., 1987. Production of Crystalline Surface-Active Glycolipids by a Strain of *Torulopsis apicola*. *J Biotechnol* **6**, 259-269.
- Takors, R., 2004. Ganzzell-ISPR-Prozessentwicklung: Chancen und Risiken. *Chem Ing Techn* **76**, 1857-1864.
- Thaniyavarn, J., Chianguthai, T., Sangvanich, P., Roongsavang, N., Washio, K., Morikawa, M., Thaniyavarn, S., 2008. Production of Sophorolipid Biosurfactant by *Pichia anomala*. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**(8), 2061-2068.
- Tuleva, B.K., Ivanov, G.R., Christova, N.E., 2002. Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* Strain. *Z Naturforsch* **57**, 356-360.
- Tulloch, A.P., Spencer, J.F.T., Gorin, P.A.J., 1962. The Fermentation of Long-Chain Compounds by *Torulopsis magnoliae*. I. Structures of the Hydroxy Fatty Acids Obtained by the Fermentation of Fatty Acids and Hydrocarbons. *Can J Chem* **46**, 3337-3351.
- Tulloch, A.P., Hill, A., Spencer, J.F.T., 1968a. Structure and Reactions of Lactonic and Acidic Sophorosides of 17-Hydroxydecanoic Acid. *Can J Chem* **46**, 3337-3351.
- Tulloch, A.P., Spencer, J.F.T., Deinema, M.H., 1968b. A New Hydroxy Fatty Acid Sophoroside from *Candida bogoriensis*. *Can J Chem* **46**, 345-348.
- Ueno, A., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yumoto, I., Okuyama, H., 2006. Bacterial Community Changes in Diesel-Oil-Contaminated Soil Microcosms Biostimulated with Luria-Bertani Medium or Bioaugmented with a Petroleum-Degrading Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* Strain WatG. *J Basic Microbiol* **46**(4), 310-317.
- Van Bogaert, I.N., Saerens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W., Vandamme, E.J., 2007a. Microbial Production and Application of Sophorolipids. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**(1), 23-34.
- Van Bogaert, I.N., De Maeseneire, S.L., De Schamphelaire, W., Develter, D., Soetaert, W., Vandamme, E.J., 2007b. Cloning, Characterization and Functionality of the Orotidine-5'-Phosphate Decarboxylase Gene (URA3) of the Glycolipid-Producing Yeast *Candida bombicola*. *Yeast* **24**(3), 201-208.
- Van Bogaert, I.N., De Maeseneire, S.L., Develter, D., Soetaert, W., Vandamme, E.J., 2008a. Development of a Transformation and Selection System for the Glycolipid-Producing Yeast *Candida bombicola*. *Yeast* **25**(4), 273-278.
- Van Bogaert, I.N., De Maeseneire, S.L., Develter, D., Soetaert, W., Vandamme, E.J., 2008b. Cloning and Characterisation of the Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Gene of *Candida bombicola* and Use of its Promoter. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**(10), 1085-92.
- Van Bogaert, I.N., Develter, D., Soetaert, W., Vandamme, E.J., 2008c. Cerulenin inhibits de novo sophorolipid synthesis of *Candida bombicola*. *Biotechnol Lett* **30**(10), 1829-1832.

- Van Bogaert, I.N., Sabirova, J., Develter, D., Soetaert, W., Vandamme, E.J., 2009a. Knocking out the MFE-2 Gene of *Candida bombicola* Leads to Improved Medium-Chain Sophorolipid Production. *FEMS Yeast Res*, electronic publication
- Van Bogaert, I.N., Demey, M., Develter, D., Soetaert, W., Vandamme, E.J., 2009b. Importance of the Cytochrome P450 Monooxygenase CYP52 Family for the Sophorolipid-Producing Yeast *Candida bombicola*. *FEMS Yeast Res* **9**(1), 87-94.
- Vasileva-Tonkova, E., Gesheva, V., 2007. Biosurfactant Production by Antarctic Facultative Anaerobe *Pantoea* sp. During Growth on Hydrocarbons. *Curr Microbiol* **54**(2), 136-141.
- Vollbrecht, E., Heckmann, R., Wray, V., Nimtz, M., Lang, S., 1998. Production and Structure Elucidation of Di- and Oligosaccharide Lipids (Biosurfactants) from *Tsukamurella* sp. nov. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 530-537.
- Vollbrecht, E., Rau, U., Lang, S., 1999. Microbial Conversion of Vegetable Oils into Surface-Active Di-, Tri- and Tetrasaccharide Lipids (Biosurfactants) by the Bacterial Strain *Tsukamurella* spec. *Fett/Lipid* **101**, 389-394.
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., Vater, J., 1997. Antimycoplasma Properties and Application on Cell Cultures of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 44-49.
- Weber, L., Stach, J., Haufe, G., Hommel, R., Kleber, H.P., 1990. Elucidation of the Structure of an Unusual Cyclic Glycolipid from *Torulopsis apicola*. *Carbohydr Res* **206**, 13-19.
- Whang, L.M., Liu, P.W., Ma, C.C., Cheng, S.S., 2008. Application of Biosurfactants, Rhamnolipid, and Surfactin, for Enhanced Biodegradation of Diesel-Contaminated Water and Soil. *J Hazard Mater* **151**(1), 155-163.
- Wicke, C., Hüners, M., Wray, V., Nimtz, M., Bilitewski, U., Lang, S., 2000. Production and Structure Elucidation of Glycoglycerolipids from a Marine Sponge-Associated Microbacterium species. *J Nat Prod* **63**, 621-626.
- Willumsen, P.A., Karlson, U., 1997. Screening of Bacteria, Isolated from PAH-contaminated Soils, for Production of Biosurfactants and Bioemulsifiers. *Biodegradation* **7**, 415-423.
- Zhang, J., Collins, A., Chen, M., Knyazev, I., Gentz, R., 1998. High-Density Perfusion Culture of Insect Cells with a BioSep Ultrasonic Filter. *Biotechnol Bioeng* **59**, 351-359.
- Zhou, Q.H., Klekner, V., Kosaric, N., 1992. Production of Sophorose Lipids by *Torulopsis bombicola* from Safflower Oil and Glucose. *J Am Oil Chem Soc* **69**, 89-91.
- Zhou, Q.H., Kosaric, N., 1995. Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida bombicola*. *J Am Oil Chem Soc* **72**, 67-71.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APG	Alkylpolyglycoside
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
C	Kohlenstoff
C _{Feed}	Zellkonzentration im Feed
C _{Fi}	Zellkonzentration im Filtrat
CFU	Colony Forming Unit, keimbildende Einheit
CHO-Zellen	Zellen einer Chinese Hamster Ovary-Zelllinie
cmc	critical micelle concentration - kritische Micellenkonzentration
CO ₂	Kohlendioxid
D	Dalton, Einheit der atomaren Masse
dest. H ₂ O	Destilliertes Wasser
$\Delta\rho$	Dichte-Differenz
d _p	Partikeldurchmesser
DSP	Downstream Processing
η	Dynamische Viskosität
FDA	Fluoresceindiacetat
g	Beschleunigungskonstante
GC-MS	Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HL60	Menschliche Leukämie-Zelllinie (Human Leukaemia)
K	Kelvin, Einheit der Temperatur
λ	Wellenlänge
MEL	Mannosylerythritolipid
MFE-2	Bezeichnung eines Gens, das am Fettsäure-Stoffwechsel beteiligt ist
MG	Molekulargewicht
N	Newton - Einheit der Kraft
N ₂	Stickstoff
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	Reduzierte Form des NADP
NMWC	Nominal Molecular Weight Cut-Off
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PI	Propidiumiodid
pN	Druck unter Normbedingungen
P _v	Produktbildungsrate
Q _{CO2}	Kohlendioxidbildungsrate
Q _{O2}	Sauerstoffaufnahme
R	allgemeine Gaskonstante
RP	Reversed Phase
RQ	respiratorischer Quotient
<i>rhlAB</i>	Bezeichnung eines Gens, das an der Rhamnoselipid-Synthese beteiligt ist
RL	Rhamnoselipid
SL	Sophoroselipid
SBO	Sonnenblumenöl
Tab.	Tabelle

T_N	Temperatur unter Normbedingungen
TL	Trennleistung
UES	Ultrasonically Enhanced Settling
URA3	Bezeichnung eines Gens, das am Uracil-Stoffwechsel beteiligt ist
UV	Ultraviolettes Licht
V_N	Volumenstrom der Zuluft unter Normbedingungen
V_R	Reaktorvolumen
v_S	Sinkgeschwindigkeit
v/v	Volumen auf Volumen bezogen
x_i^A	Molenbruch der Komponente i im Gasaustritt
x_i^E	Molenbruch der Komponente i im Gaseintritt
YM	Yeast Malt
$Y_{P/S}$	Produktausbeutekoeffizient der Produktbildung bezogen auf den Substratverbrauch
$Y_{P/X}$	Produktausbeutekoeffizient der Produktbildung bezogen auf die Biomassebildung
$Y_{X/S}$	Ertragskoeffizient der Zellmassenbildung bezogen auf den Substratverbrauch

8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Verhalten von Tensidmolekülen an Grenzflächen und in wässrigen Lösungen. Zunächst wird an der Wasser-Luft-Grenzfläche eine monomolekulare Tensidschicht ausgebildet. Oberhalb der cmc bilden sich Micellen genannte, geordnete Strukturen. S. 2
- Abb. 2:** Strukturformeln zweier Hauptkomponenten von Sophoroselipidgemischen aus Kultivierungen mit *Candida bombicola* auf Glucose und Ölsäure. Links das diacetylierte lactonische Sophoroselipid (vorherrschend), rechts die desacetylierte Säureform. S. 7
- Abb. 3:** Strukturformel eines Alkylsophorosids aus Kultivierungen mit *Candida bombicola* mit Glucose und 2-Dodecanol. S. 8
- Abb. 4:** Beispielstruktur von Mannosylerythritolipiden aus *Pseudozyma aphidis*. MEL A: $R_1 = R_2 = \text{Acetyl}$; MEL B: $R_1 = \text{Acetyl}$, $R_2 = \text{H}$; MEL C: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Acetyl}$. $n = 6 - 10$; MEL D: $R_1 = R_2 = \text{H}$. S. 10
- Abb. 5:** Strukturen der Rhamnoselipide von *Pseudomonas aeruginosa*. S. 11
- Abb. 6:** Gemisch aus verschiedenen Di- u. Oligosaccharidlipiden, das bei der Kultivierung von *Tsukamurella spec.* gebildet wird. Die genaue Zusammensetzung variiert mit den Kultivierungsbedingungen. S. 14
- Abb. 7:** Stehende Welle, gebildet aus der Überlagerung einer fortschreitenden Welle und ihrer Reflexion (a). Die Überlagerung wird stationär (b). Die Amplitudenverteilung wird „Einhüllende“ genannt (c). Aus: Radel 2002 S. 17
- Abb. 8:** Agglomeration suspendierter Partikel in einem stehenden akustischen Feld. Zunächst werden die Partikel durch Strahlungskräfte in die Antiknotenebenen geschoben. Dort wirken weitere Kräfte in Richtung der Amplitudenmaxima, so dass es dort zur Aggregation kommt. S. 18
- Abb. 9:** Phasen des UES: gleichmäßig verteilte Partikel (a) werden durch Strahlungskräfte in die Antiknotenebenen gedrängt (b). Transverse Strahlungskräfte konzentrieren sie dort weiter auf (c). Dieser Vorgang findet an allen Knotenebenen des stehenden Feldes parallel statt (d). Schließlich sinken die Agglomerate aufgrund der Schwerkraft zu Boden. Aus: Radel 2002 S. 19
- Abb. 10:** Akustisches Zell-Rückhaltungssystem für Bioreaktoren. Der Bereich, in dem das stehende Ultraschallfeld sich ausbildet, besteht aus zwei Kammern: Wasserkühlung und Trennbereich. Der Feed-Strom teilt sich auf in einen zellarmen Filtrat- und einen aufkonzentrierten Retentat-Strom. S. 20
- Abb. 11:** Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstrat bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als alleinigen C-Quellen im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8 \text{ d}$, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose S. 42
- Abb. 12:** Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als C-Quellen produzierten SL. Bedingungen: Normalphase (NP): stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Reversed Phase (RP): stationäre Phase: RP-18-Kieselgel F_{254s}, mobile Phase: Methanol/Wasser 90/10 (v/v). Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure. S. 43
- Abb. 13:** Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie n-Hexadecan und Mithagol-S als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: $t = 8 \text{ d}$, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h (und nach 96 h bei der Kultivierung auf Glucose/Mithagol-S). S. 45

- Abb. 14:** Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als hydrophilen C-Quellen sowie n-Hexadecan (H) und Mithagol-S (M) als hydrophoben Co-Substraten produzierten SL. Bedingungen: stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure. S. 46
- Abb. 15:** Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Saccharose als hydrophiler C-Quelle sowie 2-Dodecanol und 2-Tetradecanol als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: t = 8 d, 100 ml Medium mit 100 g/l Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h. S. 48
- Abb. 16:** Strukturformeln von Isooleylalkohol, der Hauptkomponente von Speziol 936U; 2-Ethyl-1-Hexanol und 2-Hexyl-1-Decanol, der Hauptkomponente von Rilanit G16. S. 49
- Abb. 17:** Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Speziol 936U, 2-Ethyl-1-Hexanol und Rilanit G16 als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: t = 8 d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h. S. 50
- Abb. 18:** Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als hydrophilen C-Quellen sowie Speziol 936U (S), 2-Ethyl-1-Hexanol (EH), Rilanit G 16 (R), 2-Dodecanol (D) und 2-Tetradecanol (T) als hydrophoben Co-Substraten produzierten SL. Bedingungen: stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure. S. 51
- Abb. 19:** Dünnschichtchromatogramme des mit Glucose und Rilanit G 16 hergestellten Rohproduktes (GR) sowie dessen Hauptkomponenten GL-S1 und SL-S3 nach Aufreinigung durch MPLC. Bedingungen: stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure. S. 54
- Abb. 20:** Strukturformel der Hauptkomponente des durch Kultivierung von *C. bombicola* ATCC 22214 mit Glucose und Rilanit G16 hergestellten Glycolipid-Gemisches. S. 55
- Abb. 21:** Strukturformeln von Ölsäure und Erukasäure. S. 55
- Abb. 22:** Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Ölsäure und Erukasäure als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: t = 8 d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h. S. 56
- Abb. 23:** Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als hydrophilen C-Quellen sowie Ölsäure(ÖS) und Erukasäure (ES) als hydrophoben Co-Substraten produzierten SL. Bedingungen: stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure. S. 57
- Abb. 24:** Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Sonnenblumenöl (SBO), Calendulaöl und Senföl als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: t = 8 d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h (und nach 96 h bei der Kultivierung auf Glucose/Calendulaöl). S. 58
- Abb. 25:** Konzentration von Biotrockenmasse, Produkt und Restsubstraten bei der Kultivierung von *Candida bombicola* mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Rapsöl ER (reich an Erukasäure) und Rapsöl EA (arm an Erukasäure) als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: t = 8 d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h. S. 59

Abb. 26: Dünnschichtchromatogramm der mit Glucose (G) bzw. Saccharose (S) als hydrophilen C-Quellen sowie Sonnenblumenöl (SBO), Calendulaöl (C), Senföl (Se) und erukasäurereichem Rapsöl (RER) als hydrophoben Co-Substraten produzierten SL. Bedingungen: Normalphase (NP): stationäre Phase: Kieselgel 60 F ₂₅₄ , mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure.	S. 60
Abb. 27: Strukturformel von Calendulasäure	S. 62
Abb. 28: Verfahrensschema der im Kreislauf betriebenen Auftrennung von <i>C. bombicola</i> -Suspension.	S. 63
Abb. 29: Photographie des Trennvorgangs von <i>C. bombicola</i> -Zellsuspension durch ein 10 l/d Ultraschalltrenngerät. Die Aufnahme zeigt die Vorgänge in der Trennkammer.	S. 64
Abb. 30: Photographie des Trennvorgangs von <i>C. bombicola</i> -Zellsuspension durch ein 50 l/d Ultraschalltrenngerät. Die Aufnahme zeigt die Vorgänge in der Trennkammer.	S. 65
Abb. 31: Trennleistung des 50 l/d-Ultraschalltrenngerätes für <i>C. bombicola</i> -Zellen in Abhängigkeit vom Permeat-Durchsatz.	S. 68
Abb. 32: Trennleistung des 50 l/d-Ultraschalltrenngerätes für <i>C. bombicola</i> -Zellen in Abhängigkeit von der Zellkonzentration. Der Durchsatz betrug 2,5 l/d.	S. 69
Abb. 33: Trennleistung des 50 l/d-Ultraschalltrenngerätes für <i>C. bombicola</i> -Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an SBO. Die Zellkonzentration betrug 12,2 g/l, der Durchsatz 2,5 l/d.	S. 70
Abb. 34: Dünnschichtchromatogramm der SL aus den Teilströmen einer Ultraschalltrennung von <i>C. bombicola</i> -Suspension mit einem Durchsatz von 2,4 l/d. Bedingungen der DC: stationäre Phase: Kieselgel 60 F ₂₅₄ , mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v), Sprühreagenz: α -Naphthol-Schwefelsäure.	S. 72
Abb. 35: Mikroskopische Aufnahme des Feed- (a), Filtrat- (b) sowie Retentat-Stromes (c) der Trennung einer <i>C. bombicola</i> -Suspension mit Sophoroselipiden durch UES bei einer Flussrate von 2,4 l/d. 400fache Vergrößerung.	S. 72
Abb. 36: Biomassen der Teilströme einer Mikrofiltration (Polysulfon-Hohlfasermembran, 0,1 μ m Porengröße) von <i>C. bombicola</i> -Suspension. R = Retentat, P = Permeat. 0 = Ausgangssuspension, 1 = nach 10 min, 2 = nach 30 min.	S. 74
Abb. 37: SL-Konzentrationen der Teilströme einer Mikrofiltration (Polysulfon-Hohlfasermembran, 0,1 μ m Porengröße) von <i>C. bombicola</i> -Suspension. R = Retentat, P = Permeat. 0 = Ausgangssuspension, 1 = nach 10 min, 2 = nach 30 min.	S. 75
Abb. 38: SL-Konzentrationen der Teilströme einer Ultrafiltration (Polysulfon-Hohlfasermembran, 5 kDa Cut-Off) von <i>C. bombicola</i> -Suspension. R = Retentat, P = Permeat. 0 = Ausgangssuspension, 1 = nach 10 Minuten.	S. 75
Abb. 39: Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von <i>C. bombicola</i> im 10 l-Bioreaktor mit SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 42,6 g/l.	S. 78
Abb. 40: Verlauf der Parameter pH und pO ₂ einer Kultivierung von <i>C. bombicola</i> im 10 l-Bioreaktor mit SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 42,6 g/l.	S. 78
Abb. 41: Verlauf der Parameter Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} , Kohlendioxidbildungsrate Q_{CO_2} und Respirationskoeffizient RQ einer Kultivierung von <i>C. bombicola</i> im 10 l-Bioreaktor mit SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose,	S. 79

- Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 42,6 g/l.
- Abb. 42:** Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit Glucose (10 g/(l·d))- und SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebener Glucose: 180 g/l, Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 55,4 g/l. [Kultivierung Nr.1/Tab. 13] S. 81
- Abb. 43:** Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit Glucose (30 g/(l·d))- und SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebener Glucose: 310 g/l, Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 46,6 g/l. [Kultivierung Nr. 2/Tab.14] S. 83
- Abb. 44:** Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit Glucose (50 g/(l·d))- und SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebener Glucose: 450 g/l, Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 47,2 g/l. [Kultivierung Nr.1/Tab.15] S. 85
- Abb. 45:** Übersicht der Anordnung einer UES-Anlage zur prozessintegrierten Abtrennung von Zellen bei der Herstellung von Sophoroselipiden mit *C. bombicola*. S. 88
- Abb. 46:** Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 24,7 g/l. UES wurde nach 80 h für 4 h und nach 100 h für 2 h verwendet, Details s. Text. Messwerte, die zu weit außerhalb des möglichen Bereiches sind, sind nicht verbunden und ohne Ausfüllung dargestellt. S. 89
- Abb. 47:** Verlauf der Parameter BTM, Glucose, Sophoroselipide und SBO einer Kultivierung von *C. bombicola* im 10 l-Bioreaktor mit Glucose (50 g/(l·d))- und SBO-Zufütterung und folgenden Startbedingungen: 9 l Volumen, 100 g/l Glucose, Drehzahl 250/min, Belüftungsrate 4,5 l/min. Gesamtmenge an zugegebener Glucose: 450 g/l, Gesamtmenge an zugegebenem SBO: 39,9 g/l. UES wurde nach 48 h für 12 h und nach 72 h für 12 h verwendet, Details s. Text. S.91
- Abb. 48:** Trennleistung des 50 l/d-Ultraschalltrenngerätes für *C. bombicola*-Zellen in Abhängigkeit vom Permeat-Durchsatz, Darstellung der annähernd linearen Abhängigkeit der Messwerte im Intervall $1,4 < \text{Durchsatz} < 7,2$. S. 102
- Abb. 49:** Photographien des Trennvorgangs von *C. bombicola*-Zellsuspension durch ein 50 L/d Ultraschalltrenngerät bei unterschiedlichen Durchsätzen. Die Aufnahmen zeigen die Vorgänge in der Trennkammer. Links: 1,4 l/d, rechts: 7,2 l/d. S. 103

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung von Sonnenblumenöl, Senföl und Rapsöl	S. 25
Tab. 2: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten in SL aus der Kultivierung von <i>C. bombicola</i> ATCC 22214 mit Glucose als alleiniger C-Quelle.	S. 44
Tab. 3: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten in SL aus der Kultivierung von <i>C. bombicola</i> ATCC 22214 mit Glucose als hydrophiler C-Quelle und n-Hexadecan sowie Mithagol-S als Co-Substrat.	S. 47
Tab. 4: Überblick über die erzielten Ertragskoeffizienten bei Kultivierungen von <i>C. bombicola</i> mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie 2-Dodecanol, 2-Tetradecanol, Speziol 936U, 2-Ethyl-1-Hexanol und Rilanit G16 als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: t = 8 d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h.	S. 51
Tab. 5: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten in SL aus der Kultivierung von <i>C. bombicola</i> ATCC 22214 mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen und Rilanit G16 sowie 2-Ethyl-1-Hexanol als Co-Substraten.	S. 53
Tab. 6: ^1H and ^{13}C NMR-Daten, aufgenommen in 70:30 $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ von 1-O- β -Glucopyranosyl-2-Hexyldecan-1-ol aus der Kultivierung von <i>C. bombicola</i> mit Glucose und Rilanit G16.	S. 55
Tab. 7: Überblick über die erzielten Ertragskoeffizienten bei Kultivierungen von <i>C. bombicola</i> mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie Ölsäure und Erukasäure als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: t = 8 d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h.	S. 57
Tab. 8: Überblick über die erzielten Ertragskoeffizienten bei Kultivierungen von <i>C. bombicola</i> mit Glucose und Saccharose als hydrophilen C-Quellen sowie SBO, Calendulaöl, Senföl sowie Rapsöl ER (reich an Erukasäure) und Rapsöl EA (arm an Erukasäure) als hydrophoben Co-Substraten im Schüttelkolben. Bedingungen: t = 8 d, 100 ml Medium mit 100 g/l Glucose/Saccharose, Zugabe von je 17 g/l Co-Substrat nach 24, 48 und 72 h (und nach 96 h bei der Kultivierung auf Glucose/Calendulaöl).	S. 61
Tab. 9: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten in SL aus der Kultivierung von <i>C. bombicola</i> ATCC 22214 mit Glucose als hydrophilen C-Quellen sowie SBO und Calendulaöl als Co-Substraten.	S. 61
Tab. 10: Anteile überlebender Zellen in unterschiedlichen Teilströmen bei Ultraschalltrennvorgängen. Der Lebendzellanteil wurde durch PI-Färbung und anschließendes Auszählen bestimmt. A und B bezeichnen unterschiedliche Experimente.	S. 67
Tab. 11: Vergleich der Biomasse- und Sophoroselipidkonzentrationen der Teilströme einer Ultraschalltrennung von <i>C. bombicola</i> -Suspension. Der Durchsatz betrug 2,4 l/d.	S. 71
Tab. 12: Wachstums- und Produktbildungsparameter der Produktion von Sophoroselipiden mit <i>C. bombicola</i> ohne Glucose-Zufütterung nach 192 h.	S. 79
Tab. 13: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter der Kultivierungen mit <i>C. bombicola</i> mit 10 g/(l·d) Glucose-Zufütterung, bestimmt zum Ende der Kultivierungen. Die Ergebnisse der in Abb. 42 dargestellten Kultivierung sind gelb hinterlegt, die Mengen an verbrauchtem Substrat grau.	S. 82

Tab. 14: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter der Kultivierungen mit <i>C. bombicola</i> mit 30 g/(l·d) Glucose-Zufütterung, bestimmt zum Ende der Kultivierungen nach 192 h. Die Ergebnisse der in Abb. 43 dargestellten Kultivierung sind gelb hinterlegt, die Mengen an verbrauchtem Substrat grau.	S. 84
Tab. 15: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter der Kultivierungen mit <i>C. bombicola</i> mit 50 g/(l·d) Glucose-Zufütterung, bestimmt zum Ende der Kultivierungen nach 192 h. Die Ergebnisse der in Abb. 44 dargestellten Kultivierung sind gelb hinterlegt, die Mengen an verbrauchtem Substrat grau.	S. 86
Tab. 16: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter einer Kultivierung mit <i>C. bombicola</i> ohne Glucose-Zufütterung mit integrierter Ultraschallabtrennung, bestimmt zum Ende der Kultivierung nach 192 h.	S. 90
Tab. 17: Übersicht der Wachstums- und Produktbildungsparameter einer Kultivierung mit <i>C. bombicola</i> mit 50 g/(l·d) Glucose-Zufütterung mit integrierter Ultraschallabtrennung, bestimmt zum Ende der Kultivierung nach 192 h.	S. 92

10. Lebenslauf

Olof Palme

Klütstraße 25
31787 Hameln

Tel.: 05151 / 4089250

E-mail: ol.palme@googlemail.com

Persönliche Daten

Geburt	08.01.1975 in Fulda
Familienstand	verheiratet 2 Kinder

Schulbildung

08 1981 - 06 1987	Grundschule in Neuhof, Kreis Fulda
-------------------	------------------------------------

08 1987 - 06 1994	Rabanus-Maurus-Schule Fulda, Abschluss: Abitur
-------------------	--

Zivildienst

11 1994 - 01 1995	Hofgut Sassen, Schlitz/Sassen
02 1995 - 01 1996	Heinrich-Herrmann-Schule, Schlüchtern

Studium

10 1996 - 03 2003	Studiengang „Biotechnologie“ an der Technischen Universität Braunschweig, Abschluss: Diplom-Biotechnologe
-------------------	--

wiss. Hilfskraft

02 - 04 1999	am Institut für Bioverfahrenstechnik an der Technischen Universität Braunschweig
--------------	---

Tätigkeiten

05 2003 - 04 2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter zum Zwecke der Promotion am Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Biotechnologie, der Technischen Universität Braunschweig
-------------------	---

09 2007 - 12 2007	befristete Tätigkeit im Bereich Anwendungstechnik bei Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg
-------------------	---

seit 06 2008	Mitarbeiter im Bereich Arzneimittelzulassung bei hameln rds gmbh, Hameln
--------------	---